



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Proliferación de células madre espermatogoniales
(SSC) de alpaca (*Vicugna pacos*) y su posterior
criopreservación**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga**

AUTOR

Jhakelin Gloria REYES VASQUEZ

ASESOR

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Reyes, J. (2018). *Proliferación de células madre espermatogoniales (SSC) de alpaca (Vicugna pacos) y su posterior criopreservación*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



12398 A

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

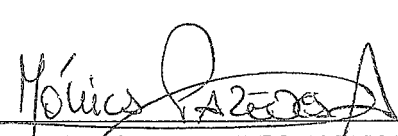
Siendo las 14:15... horas del 12 de noviembre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga de JHAKELIN GLORIA REYES VASQUEZ.

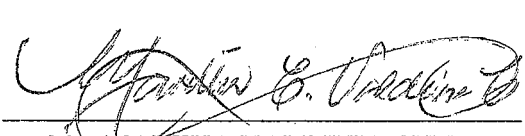
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 015-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: "PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES (SSC) DE ALPACA (*Vicugna pacos*) Y SU POSTERIOR CRIOPRESERVACIÓN", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga a JHAKELIN GLORIA REYES VASQUEZ y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:15... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 12 de noviembre de 2018


Dra. MONICA PAREDES ANAYA
(PRESIDENTA)


Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)


Mg. PATRICIA WOLL TOSO
(MIEMBRO)

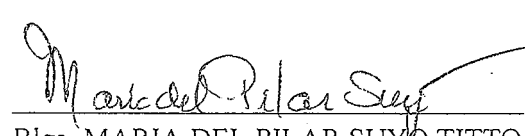

Blga. MARIA DEL PILAR SUYO TITTO
(MIEMBRO)

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	11
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	13
1. Espermatoogénesis y ciclo del epitelio seminífero.....	13
2. Cultivo celular	16
Principales parámetros	17
3. Criopreservación	23
Fundamentos básicos de la criopreservación	24
Crioprotectores empleados	27
Optimización de protocolos de criopreservación	30
4. Células madre espermatoogoniales (SSC)	31
Características de las SSC	32
Nicho de las SSC	34
Definición del fenotipo de SSC	36
Cultivo de SSC.....	37
Criopreservación de SSC	43
5. <i>Vicugna pacos</i>	46
Aspectos generales	46
Aspectos reproductivos	49
Aplicación de Biotecnologías reproductivas	50
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	52
PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	53
1. Problema general	53
2. Problemas específicos.....	53

FORMULACIÓN DE OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS 53

1. **Objetivo general** 53
2. **Objetivos específicos** 53

HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN 54

1. **Hipótesis.-** 54
2. **Variables de la Investigación. -** 54

MATERIALES Y MÉTODOS 55

- Materiales** 55
- Material biológico: 55
- Material de laboratorio: 55

- Métodos** 57
- Protocolo de Aislamiento de Células Madre Espermatogoniales (SSC) 57
- Cultivo y proliferación de células madre espermatogoniales *In vitro* 60
- Criopreservación y descongelamiento de células testiculares cultivadas y no cultivadas 61
- Evaluación mediante citometría de flujo 62
- Análisis estadístico 63

RESULTADOS 64

- Parámetros iniciales de las muestras testiculares** 64
- Vitalidad y concentración de las suspensiones de células testiculares** 65
- Evaluación y caracterización de las SSC mediante citometría de flujo** 69
- Cultivo celular** 72
- Cultivo de las SCI (FP) 72
- Cultivo de las muestras criopreservadas (CP) 73

- Comparación de SSC y calidad celular de las muestras FP, CP y PC** 75

DISCUSIÓN 80

CONCLUSIONES 90

RECOMENDACIONES 91

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.- 92

ANEXOS	114
Anexo 1: Composición de los medios de cultivo empleados	114
Anexo 2: Muestras empleadas en el presente trabajo, se detallan fechas de trabajo y medios de cultivo.....	115
Anexo 3: Parámetros iniciales evaluados	116
Anexo 3: Valores de vitalidad de las células testiculares.....	117
Anexo 4: Porcentaje de vitalidad de las células testiculares.....	118
Anexo 5: Estadísticos evaluados (Pruebas de normalidad).....	119
Anexo 6: Galería de fotos de evaluación de parámetros espermáticos	121
Anexo 7: Galería de fotos de procesamiento de las muestras testiculares	122

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Células germinales presentes en el túbulo seminífero y fases de la espermatogénesis (Tomado de Auger (2018)).....	15
Figura 2: Porcentaje de vitalidad de las SCI de todas las muestras empleadas y el valor promedio (70.74%)	66
Figura 3: Evaluación de la vitalidad con azul de Tripán de las células testiculares después del proceso de aislamiento enzimático.....	66
Figura 4: Gráficos de correlación entre los parámetros iniciales evaluados.	68
Figura 5: Ploteo y ubicación de las células redondas (recuadro verde), donde se ubican las SSC (a), así como la ubicación en el plot de citometría de las células con Potencial mitocondrial activo (recuadro rojo), en apoptosis temprana (recuadro amarillo) y apoptosis (recuadro naranja) (b).	69
Figura 6: Poblaciones celulares establecidas de acuerdo a la Tabla 7	70
Figura 7: Calidad de las SSC de acuerdo a la Tabla 8. Se observan las células con potencial mitocondrial activo (a), aquellas con menor potencial mitocondrial (b), las células en apoptosis temprana (c) y células en apoptosis (d)	71
Figura 8: Comparación del porcentaje de SSC en cada tipo de muestra.	77
Figura 9: Comparación de la calidad de las SSC en cada tipo de muestra.	77
Figura 10: Variación del porcentaje y calidad de las SSC en los tres tipos de muestras evaluadas.	78
Figura 11: Células testiculares en cultivo de las muestras FP (a), muestras proliferadas y criopreservadas observadas luego del descongelamiento (b) y muestras proliferadas luego de una criopreservación (c).	79
Tabla 1: Composición de los medios básicos más empleados (Modificado de Yang & Xiong (2012) y Yao & Asayama (2017)).....	20
Tabla 2: Proporciones de las espermatogonias indiferenciadas o SSC (*) en algunas especies de interés.	33
Tabla 3: Medios de cultivo más empleados para el cultivo de SSC de diferentes especies.	42
Tabla 4: Tabla comparativa de los métodos de criopreservación de las SSC	44
Tabla 5: Valores promedio de los parámetros iniciales evaluados (n=22).....	64
Tabla 6: Valores de vitalidad y concentración de las SCI luego del aislamiento enzimático (n=22).....	65
Tabla 7: Subpoblaciones establecidas en la población de células redondas mediante el marcaje con DBA.FITC	70
Tabla 8: Evaluación de la calidad de las SSC mediante el marcaje con el Kit MItopotential Red.	71
Tabla 9: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras Frescas Proliferadas (FP).	73
Tabla 10: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras Criopreservadas Proliferadas (CP).	74
Tabla 11: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras Proliferadas Criopreservadas (PC).	75
Tabla 12: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras FP, CP y PC.	76

DEDICATORIA

Para aquellas personas que luchan por sus sueños, para que una palabra de aliento o un gesto noble las ayude en su lucha constante.

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanas por su compañía, confianza y apoyo incondicional. Gracias por su paciencia.

A mi familia, porque gracias a ellos pude lograr el sueño de ingresar a la mejor universidad nacional del Perú. Gracias por su confianza.

A mi estimada profesora Martha Valdivia, quien confió en mí y me dio la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación. Gracias por su ejemplo.

A mis compañeros de Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, un excelente grupo de investigadores con quienes he tenido la oportunidad de dar los primeros pasos en el maravilloso mundo de la ciencia. Gracias por su compañía.

A todas las personas que han contribuido en mi formación no solo como profesional, si no como persona.

A Dios, quien día a día me muestra que aquel que va por el camino de la sabiduría siempre va por el camino correcto.

Al Financiamiento del Proyecto de grupo de Investigación 2017, código N° 11B17100101 y Programa de promoción de Tesis de Pregrado, código N° B17100144a.

RESUMEN

Las células madre espermatogoniales (SSC) son las células madre adultas que originan las células del linaje espermático por lo que son fundamentales para la fertilidad masculina. Su manejo permite una gran variedad de aplicaciones dentro de la biotecnología reproductiva como la amplificación de líneas germinales de valor agrícola, la preservación de la diversidad genética o la preservación de especies. Las SSC son escasas dentro de las poblaciones de células testiculares y debido a ello, las técnicas de cultivo celular y criopreservación permiten un mejor manejo y la posibilidad de conservarlas de forma indefinida. En ese contexto, el presente trabajo propone el empleo de suspensiones de células testiculares, las cuales albergan a las SSC y el empleo del cultivo celular y criopreservación en alpaca para el desarrollo de nuevas tecnologías reproductivas en esta especie.

El objetivo de este trabajo fue comparar el porcentaje y calidad postdescongelamiento de SSC de alpaca proliferadas y no proliferadas *in vitro*. Para ello se emplearon biopsias testiculares de 22 animales provenientes del camal municipal de Huancavelica (aproximadamente 22 horas *post mortem*). Los parámetros espermáticos iniciales (movilidad y concentración) fueron evaluados en cada muestra a partir de espermatozoides epididimarios. Se obtuvieron suspensiones de células testiculares mediante digestiones enzimáticas y se evaluó la concentración y vitalidad de las células, luego, las células testiculares fueron cultivadas *in vitro* (FP), criopreservadas mediante un protocolo termocontrolado lento, descongeladas y proliferadas (CP), o proliferadas y luego criopreservadas (PC). La evaluación de las células fue realizada mediante citometría de flujo con marcadores específicos para SSC (DBA-FITC) y Flow Collect mitopotential Red Kit para la calidad celular (Potencial mitocondrial activo y apoptosis).

El porcentaje de SSC en las muestras PC fue de $6.3\% \pm 1.2$, el cual fue mayor que el porcentaje de SSC en las muestras CP, que fue de solo $1.5\% \pm 0.3$ ($p < 0.05$). La calidad de las SSC fue mejor preservada en las PC, que mostró un 72.6% de células con potencial mitocondrial activo (PMA), 7.8 % de células apoptóticas (A) y 8.1% de células en apoptosis temprana (EA), mientras que en las CP el porcentaje de PMA fue de 59.7%, y valores de 21.3% de apoptosis y 11.5 de apoptosis temprana, que difieren significativamente de las PC y las FP.

Se concluye que el cultivo de células testiculares de alpaca previo a la criopreservación permite conservar un mayor porcentaje ($6,3\% \pm 1.2$) de SSC que la criopreservación sin cultivo previo ($1.5\% \pm 0.3$); asimismo conserva la calidad de las SSC a diferencia de las células criopreservadas sin cultivo. De esta forma, el presente trabajo constituye un primer reporte en el cual las técnicas de cultivo celular y criopreservación permiten el mantenimiento del porcentaje y la calidad de las SSC de alpaca.

SUMMARY

Spermatogonial stem cells (SSC) are the adult stem cells which originate the sperm lineage cells, that is why they are essential for male fertility. Its management allows a wide variety of applications within reproductive biotechnology such as the amplification of germinal cell lines of agricultural value, the preservation of genetic diversity or the preservation of the species. The SSC are scarce within the populations of testicular cells and due to this, the techniques of cell culture and cryopreservation allow a better management and the possibility of preserving them indefinitely. In this context, the present work proposes the use of testicular cells suspensions, which house the SSCs and the use of cell culture and cryopreservation in alpaca for the development of new reproductive technologies in this species.

The aim of this project was to compare the percentage and post-thaw quality of cultured and non-cultured SSC of alpaca. In order to do this, testicular biopsies of 23 animals from the local slaughterhouse of Huancavelica (approximately 22 hours post mortem) were used. The initial sperm parameters (mobility and concentration) were evaluated in each sample from epididymal sperm. Testicular cell suspensions were obtained by enzymatic digestion and the concentration and vitality of the cells were evaluated, then the testicular cells were cultured in vitro (FP), cryopreserved by a slow thermoregulated protocol, thawed and proliferated (CP), or proliferated and then cryopreserved (PC). The evaluation of the cells was performed by flow cytometry with specific markers for SSC (DBA-FITC) and for cell quality with Flow Celect mitopotential Red Kit (active mitochondrial potential and apoptosis).

The percentage of SSC in the PC samples was $6.3\% \pm 1.2$, which was higher than the percentage of SSC in the CP samples, which was only $1.5\% \pm 0.3$ ($p < 0.05$). The quality of the SSC was better preserved in PCs, which showed 72.6% of cells with active mitochondrial potential (PMA), 7.8% of apoptotic cells (A) and 8.1% of cells in early apoptosis (EA), whereas in the CP the percentage of PMA was 59.7%, and values of 21.3% of apoptosis and 11.5% of early apoptosis, which differ significantly from PC and FP.

In conclusion, culture of alpaca testicular cells prior to cryopreservation allows to preserve a higher percentage ($6.3\% \pm 1.2$) of SSC than cryopreservation without prior culture ($1.5\% \pm 0.3$); it also preserves the quality of the SSC unlike the cryopreserved cells without culture. In this way, the present work constitutes a first report in which the cell culture and cryopreservation techniques allow the maintenance of the percentage and quality of the SSC of alpaca.

INTRODUCCIÓN

En el Perú más de un millón de personas se dedican a la crianza de camélidos en las regiones altoandinas del Perú (Sifuentes et. al, 2018). En dichas zonas, la alpaca (*Vicugna pacos*) se ha convertido en una especie agrícola de importancia con un enfoque de técnicas de crianza moderno e intenso, puesto que es un recurso que proporciona carne, lana, combustible, transporte de bienes y constituyen un elemento de identidad cultural (Quispe et. al 2009). A pesar de dicha actividad, la crianza de este ganado no es suficientemente tecnificada como para obtener un mayor rendimiento por animal, lo que impide reducir la pobreza de dichas zonas.

Debido a su importancia, la aplicación de técnicas para el mejoramiento genético que permitan una mayor producción de fibra o carne se ha intentado establecer en esta especie, sin embargo, la aplicación de las tecnologías de mejoramiento más comunes como la criopreservación de semen o inseminación artificial se enfrentan a grandes dificultades debido a la baja producción y/o calidad espermática que presentan los machos (Evangelista, 2015, Huanca, 2016), esto, a su vez, influye en la pérdida de diversidad genética y/o fenotipos con características deseadas.

Diferentes grupos de investigación a nivel nacional e internacional han iniciado el estudio y caracterización de esta especie, desde el punto de vista reproductivo y con el mejoramiento genético como uno de los objetivos principales (Bravo et. al., 2000, Abraham, 2016, Elzawam, 2013, López, 2017 Vizcarra, 2013). Se han realizado avances en la criopreservación de semen y de espermatozoides epididimarios, inseminación artificial, cultivo de embriones, así como la evaluación de los niveles de diversidad genética, con la finalidad de establecer estrategias que permitan la selección de reproductores y la aplicación de tecnologías adecuadas para esta especie (Santiani et. al.,

2005, Muchotrigo 2017, Martinez & Ramos, 2015, Díaz, 2014, Canorio, 2008, Yalta, 2014, Condori, N., 2014)

A pesar de ello, aún no se han logrado establecer los protocolos adecuados para la preservación de semen, que es una de las técnicas más empleadas en la biotecnología reproductiva en otras especies domésticas, por lo que es necesario abarcar el estudio de las células germinales desde otro punto. En ese contexto, las células madre espermatogoniales (SSC) están siendo ampliamente estudiadas a nivel mundial en una gran variedad de especies, constituyen una alternativa para la aplicación de una gama de biotecnologías reproductivas y de conservación en especies de importancia económica, importancia ecológica, así como en especies amenazadas. El estudio de la biología de las SSC en alpaca permitiría el establecimiento de nuevas rutas para la conservación de su diversidad genética, mejoramiento genético y la producción de gametos *in vitro*.

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1. Espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero

La espermatogénesis es el proceso por el cual se producen los espermatozoides durante la vida adulta de un individuo macho a partir de un conjunto de células germinales conocidas como Células Madre Espermatogoniales o SSC (del inglés *spermatogonial stem cells*) que se ubican en la membrana basal de los túbulos seminíferos (De Rooij, 1998). En cada área del túbulo seminífero, se observa una asociación determinada de células del linaje espermatogénico, así como de células somáticas que se repiten cada cierto período, lo cual es conocido como el ciclo de epitelio seminífero (Figura 1). En este se observan los diferentes tipos celulares que existen en las gónadas masculinas, las cuales se clasifican en tres tipos generales según sus funciones: Las espermatogonias que proliferan, los espermatocitos que llevan a cabo la meiosis y las espermátidas haploides, que se diferencian en espermatozoides (De Rooij, 2017a).

Espermatogonias: Las espermatogonias son las células del linaje espermático más indiferenciadas, estas son diploides y generan células hijas diploides. Las espermatogonias indiferenciadas, que albergan a las espermatogonias de tipo A (sin heterocromatina en el núcleo) suelen clasificarse de acuerdo a su asociación con otras espermatogonias luego de la división celular, aunque su denominación varía de acuerdo al modelo establecido para cada especie (Figura 2) (Takashima & Shinobara (2018), Tagelenbosch & Rooij (1993), Aponte et. al. (2008), He et. al. (2010). En la mayoría de los modelos, estas albergan a las SSC, que son el tipo de espermatogonia indiferenciada más importante. Dentro de esta población están también las espermatogonias diferenciadas, que son aquellas que están comprometidas a la diferenciación hacia espermatocitos. Suelen clasificarse como espermatogonias intermediarias (con una

cantidad intermedia de heterocromatina en el núcleo) y espermatogonias de tipo B (mayor presencia de heterocromatina en el núcleo) (Auger, 2018).

Espermatocitos: Son las células que realizan el proceso meiótico donde se da la recombinación de los cromosomas. Los espermatocitos derivan de las espermatogonias de tipo B y entran a la profase de la meiosis I, donde se da la recombinación. Producto de esto se generan los espermatocitos secundarios, los cuales luego de la segunda división meiótica producirán las espermátides (Auger, 2018).

Espermátides: Son las células haploides, sin capacidad de dividirse y que se convertirán en espermatozoides luego de un proceso de diferenciación conocido como espermiogénesis. Durante dicho proceso, las espermátides pasan por tres procesos básicos: El ADN se condensa debido a la interacción con protaminas y proteínas básicas nucleares, se forma el acrosoma, la cola y la pieza intermedia que contiene las mitocondrias y se elimina la mayor parte del citoplasma. (Auger, 2018).

Espermatozoides: Son los gametos masculinos, células haploides altamente especializadas que poseen una cabeza, que alberga el núcleo y proteínas, así como el flagelo o cola, que permiten la fecundación del gameto femenino.

Además de las células del linaje espermático, se encuentran las células somáticas que contribuyen en la conformación del nicho espermatogénico y producen moléculas que influyen en los procesos de proliferación y diferenciación de las células germinales.

Células de Sertoli: Se ubican en la lámina basal, son reguladores paracrinos de la espermatogénesis, producen factores de crecimiento como GDNF, FGF2 y otras moléculas que promueven la proliferación celular de las SSC (De Rooij, 2017a, Kanatsu-Shinohara et. al, 2012a)

Células de Leydig: Se ubican en el espacio intersticial, producen testosterona que influye en la función de las células de Sertoli y en las SSC. Producen también el Factor

estimulante de colonia (CSF1) y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF1), importantes para la proliferación de las SSC (Kubota & Brinster, 2018)

Células mioides: Se ubican en la pared de los túbulos seminíferos, influyen en el comportamiento de las SSC mediante la producción de algunas moléculas como CSF1 y GDNF (De Rooij, 2017b)

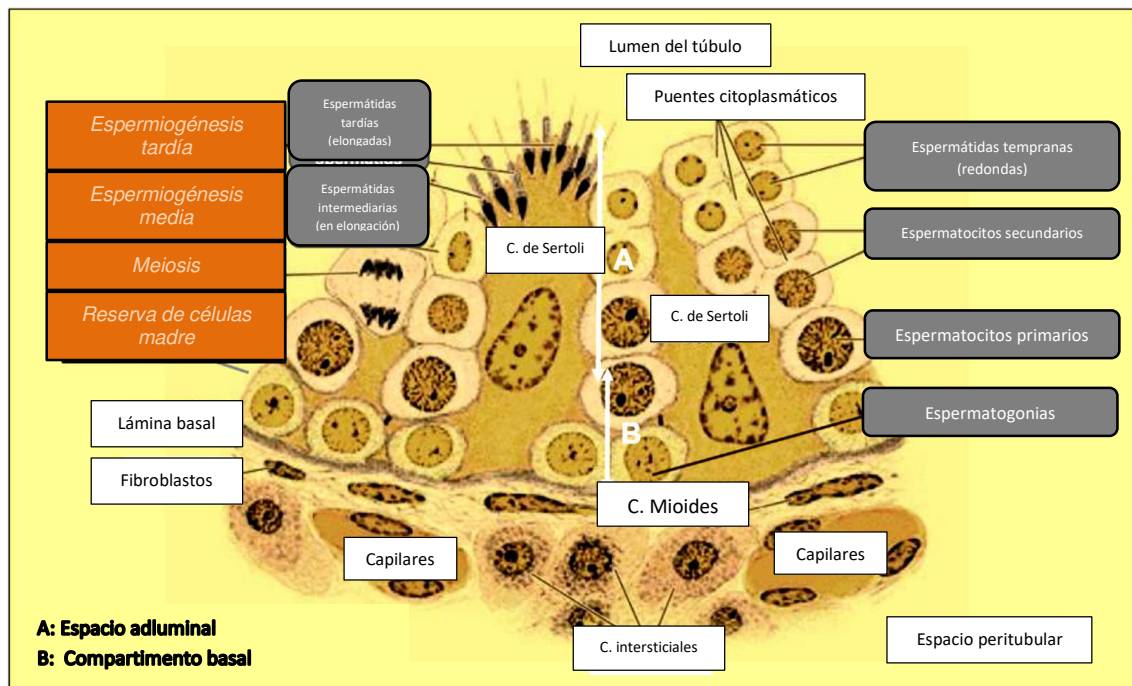


Figura 1: Células germinales presentes en el tubo seminífero y fases de la espermatogénesis (Tomado de Auger (2018))

En los mamíferos, el ciclo espermatogénico está organizado en 12 estados, establecidos en base al desarrollo del acrosoma de las espermátides (De Rooij, 2017b), la espermatogénesis dura 4.5 ciclos, mientras que la duración del ciclo del epitelio seminífero es específica y constante en cada especie, así en ratones se ha descrito que dura aproximadamente 8.6 días, en humanos 16 días (Hermann et. al., 2010), mientras que en especies domésticas como el cerdo dura entre 8.6 a 9 días, en ovinos, 10.6 (Zeng et. al., 2006) y en bovinos, 13.5 días (Salim & Entwistle, 1982)

La espermatogénesis se divide en dos fases: La fase de proliferación celular, donde las SSC se dividen sucesivamente para mantener una población de células madres y a la vez producir las células que se diferenciarán en espermatozoides, y la fase de espermiogénesis, donde se dan los cambios necesarios en las espermatidas para la producción de espermatozoides (Figura 1)

2. Cultivo celular

El cultivo celular es una técnica que permite la expansión de poblaciones celulares *in vitro* en un ambiente controlado favorable. Reemplazan el empleo de animales en el desarrollo de experimentos, de forma que se tiene mayor seguridad y calidad sobre el estudio del efecto de los factores a evaluar. Las células que se cultivan se encuentran en suspensiones celulares obtenidas de su tejido de origen mediante técnicas de disgregación mecánica o enzimática (Cultivo primario), así como pueden ser obtenidas de líneas celulares preestablecidas (Subcultivo).

Esta tecnología es ampliamente empleada en la biología celular y molecular debido a que permiten la manipulación de las células y su estudio a diferentes niveles, así mismo, constituyen material para evaluar el efecto de diferentes componentes sobre el metabolismo. Cuando una línea celular se ha establecido, su crecimiento celular se puede caracterizar en 4 fases que tendrán una duración específica de acuerdo a la línea celular conocidas como Fase de adaptación o Fase Lag, que es la fase de adaptación al sistema de cultivo, se caracteriza porque no hay división celular, su duración depende de las características de las células, el momento en el que se realiza el subcultivo y la densidad celular inicial.

La fase logarítmica del crecimiento se caracteriza porque las células se encuentran en división y proliferan activamente, por lo que vitalidad celular es la máxima. El incremento

de la densidad celular suele tener forma exponencial. Luego se observa la fase Plateau, donde el crecimiento celular llega a un máximo y se mantiene un equilibrio entre la proliferación y muerte celular por algún periodo. En esta etapa las células son más susceptibles al daño. Finalmente, la fase de muerte celular, donde la muerte predomina sobre la proliferación y puede deberse, entre otros factores, a la reducción de nutrientes. En general, los cultivos celulares deben poseer un soporte físico donde las células se encuentran en un medio que contiene los compuestos necesarios para su proliferación, como los sustratos (carbohidratos) o aminoácidos como elementos esenciales para la división celular; o vitaminas, factores de crecimiento u hormonas, que inducen procesos de proliferación, diferenciación o actúan como antioxidantes. Además, las células deben mantenerse en un ambiente con parámetros fisicoquímicos controlados, como la temperatura y la proporción de los gases (CO_2) que son principalmente mantenidos por las incubadoras, y pH u osmolaridad que suelen ser controlados por componentes del medio de cultivo y los gases de la incubadora. Todos esos factores son evaluados y estandarizados para cada tipo de cultivo celular, pero cumplen un rol similar en todos ellos.

Principales parámetros

Temperatura

La temperatura de cultivo es un parámetro que influye en la tasa de crecimiento de las células, debido a que puede acelerar o ralentizar el metabolismo y la tasa de progreso a través del ciclo celular (Watanabe & Okada, 1967). La mayoría de las células de mamíferos son mantenidas entre 37-38°C, debido a que la temperatura corporal se mantiene en ese rango. Otros tipos de células se pueden mantener a temperaturas más bajas, como las de insecto, generalmente mantenidas a 27°C, a la cual se observa mayores tasas de crecimiento, vitalidad y producción de proteínas recombinantes (Reuveny et.al,

1993), o células de peces, cultivadas entre 15-37°C (Fryer & Lannan, 1994, Bols, Mosser & Steels, 1992) ya que dichos organismos pueden regular su metabolismo en un amplio rango de temperaturas.

pH

Los cultivos de células de mamífero pueden mantenerse en valores de pH entre 6.8 a 7.6 (Eagle, 1973), pero, el mayor crecimiento de muchas líneas celulares humanas, de ratón, hámster o híbridas suele observarse a pH entre 7.2 a 7.4 (Phelan & May, 2015, Mackenzie, Mackenzie & Beck, 1961). La variación de este parámetro afecta el crecimiento y metabolismo de las células en cultivo, valores extremos de pH pueden desestabilizar la membrana citoplasmática, el ADN y proteínas, así como influir en la actividad de las enzimas o en la velocidad de las reacciones enzimáticas, puede incrementar el consumo de glucosa o glutamina o incrementar la producción de aminoácidos (Hagrot, 2011). Además, puede influir en la sensibilidad de las células a mecanismos de inhibición del crecimiento o disminuir la eficiencia de procesos posteriores al cultivo, como hibridación, transformación o criopreservación (Croce, Koprowski & Eagle, 1972, Will, Clark & Swain, 2011, Ferreira et. al, 2015).

Debido a ello, el empleo de buffers es esencial en los cultivos celulares y para su uso adecuado, este debe actuar bien a valores de pH entre 6 y 8, ser soluble en agua e impermeable, no debe alterar otros parámetros como la temperatura o fuerza iónica y no debe interferir con otros elementos del medio de cultivo (Good et. al, 1966), además debe ser inocuo para el crecimiento celular, evitar grandes fluctuaciones en el pH con eficiencia y sin la necesidad de emplear grandes cantidades de buffer (Eagle, 1971).

El empleo de los buffers TES y HEPES se ha estudiado en sistemas de cultivos cerrados, donde se observaron tasas de crecimiento celular similares a los observados en el sistema

CO₂-HCO₃ (Itagaki & Kimura, 1974). Otros buffers como MES, MOPS y PIPES se pueden emplear en el cultivo de células de mamífero (Ferreira et.al, 2015)

El CO₂ es empleado en los cultivos celulares como un elemento regulador del pH, ya que difunde en el medio de cultivo y permite el mantenimiento del sistema de buffer compuesto por CO₂-HCO₃, además permite el mantenimiento de rutas metabólicas importantes como el ciclo del ácido tricarboxílico, producción de compuestos derivados del oxalacetato, procesos de modificaciones postraduccionales de proteínas, así como en la fluidez y permeabilidad de la membrana (Blombach & Takors, 2015)

Medios de cultivo

El medio de cultivo es el componente principal de los cultivos celulares, ya que proporciona los elementos necesarios para el mantenimiento y crecimiento de las células como sales inorgánicas, carbohidratos, factores de crecimiento, hormonas, antioxidantes y buffers, que suelen ser adicionados a los medios mediante la suplementación con suero, o adicionados individualmente.

De acuerdo a los nutrientes que contienen, los medios suelen clasificarse en simples, libres de suero o de composición definida, libres de proteínas o libres de componentes derivados de animales (Van der Valk et. al, 2010)

Los medios simples proporcionan los elementos básicos para el mantenimiento de las células, como sales inorgánicas, aminoácidos esenciales, vitaminas, buffers y una fuente carbonada, generalmente glucosa (Yang & Xiong, 2012). Estos suelen ser suplementados con aminoácidos no esenciales, vitaminas y suero, y son mayormente empleados de esta forma en los cultivos rutinarios, mientras que los medios básicos pueden ser empleados para procesos de aislamiento o lavados.

Tabla 1: Composición de los medios básicos más empleados (Modificado de Yang & Xiong (2012) y Yao & Asayama (2017))

Medio	Sales	Aminoácidos	Vitaminas	Componentes adicionales	Usos
Minimum Essential Medium (MEM) (Eagle, 1959)	CaCl ₂ , KCl, MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , NaH ₂ PO ₄	13 aminoácidos esenciales	Pantotenato, Colina, Ácido Fólico, Inositol, Niacinamida, Piridoxal, Riboflavina, Tiamina	Glucosa	Cultivo celular de una variedad de células, mantenimiento de células en cultivo de tejidos
Dulbecco's Modified MEM (DMEM)(Dulbecco y Freeman, 1959)	Sales de MEM, Fe(NO ₃) ₃	Dos veces más concentrado que MEM en la mayoría de los aminoácidos, Glutamina, Glicina, Serina	Cuatro veces más concentrado que MEM en la mayoría de las vitaminas, Piridoxina	Serina, Hierro, Piruvato, Bicarbonato de Sodio, Glucosa (cuatro veces más concentrado que MEM)	Adecuado para cultivos de células embrionarias de ratón
Iscove's Modified DMEM (IMDM) (Iscove y Mekchers, 1978)	Sales de MEM a menor concentración, KNO ₃ , NaSeO ₃	13 aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales	Vitaminas de MEM cuatro veces más concentradas, Biotina, B12	Selenio, no contiene hierro, Piruvato de Sodio, HEPES, Glucosa (cuatro veces más concentrada que MEM)	Cultivo de células de proliferación de baja densidad celular, hibridomas y células transformadas.
Ham's F12	CaCl ₂ , KCl, NaCl, NaHCO ₃ , CuSO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , MgCl ₂ , CuSO ₄ , FeSO ₄	13 aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales	Pantotenato, Colina, Ácido Fólico, Inositol, Niacinamida, Piridoxina, Riboflavina, Tiamina, Biotina, B12	Glucosa, Piruvato de Sodio, Hipoxantina, Timidina, Ácido linoleico, putrescina,	Cultivo de células de hámster, medio de composición definida.

Los medios libres de suero se emplean cuando es necesario estandarizar el cultivo de líneas celulares específicas, permiten la evaluación del efecto de elementos específicos sobre el metabolismo celular, ya que, debido a que no se emplea suero, evita el efecto no controlado de este sobre el fenotipo (Van der Valk et. al, 2010). Son conocidos también como medios de composición definida ya que son suplementados con proteínas purificadas o recombinantes y otros nutrientes en una concentración determinada (Yao & Asayama, 2017)

Nutrientes

La composición de diferentes medios tiene elementos comunes que cumplen ciertas funciones en el cultivo celular:

Suero: Es la fuente animal más importante de factores de crecimiento, hormonas, lípidos, minerales y micronutrientes. El suero fetal bovino (SFB) es el tipo de suero más empleado. Permite el crecimiento de diferentes tipos celulares, además puede contener elementos que neutralizan toxinas, sin embargo, su empleo dificulta la estandarización de los cultivos debido a que su composición puede variar en cada proceso de producción (Hosios et. al, 2016).

Carbohidratos: Son la fuente principal de energía, suelen encontrarse en forma de azúcares como glucosa o galactosa (Yang & Xiong, 2012). La glucosa es metabolito más consumido durante los cultivos celulares, es procesado mediante la glicólisis y añade carbonos al ciclo del ácido cítrico, además se emplea como fuente de otras macromoléculas necesarias para la célula, como aminoácidos y lípidos (Hosios et. al, 2016, Blombach & Takors, 2015).

En algunos medios, se emplea el piruvato de sodio como una fuente adicional de carbohidratos, aunque también se le atribuye un efecto protector contra especies reactivas de oxígeno (Andrae, Singh & Ziegler-Skylakakis, 1985, O'Donnell-Tormey et. al, 1987)

Sales inorgánicas: Las sales permiten el mantenimiento de la presión osmótica, osmolaridad y el pH, así como el mantenimiento del potencial de membrana, además pueden constituir cofactores enzimáticos (Waymouth, 1970, Mizrahi & Lazar, 1988)

Aminoácidos: Son componentes esenciales para la división celular, precursores de proteínas, péptidos, ADN, ARN y de otras moléculas importantes para la célula. Los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por las células de mamífero, por lo que deben ser añadidos al medio de cultivo para prolongar la viabilidad y crecimiento. Un elemento importante es la glutamina, la cual se degrada rápidamente a amonio a 37°C y es precursor de las purinas y pirimidinas de los ácidos nucleicos (Yang & Xiong, 2012, Yao & Asayama, 2017)

Vitaminas: Son precursores de cofactores, promueven el crecimiento y algunas cumplen el rol de antioxidantes. Las más empleadas son el ácido fólico, riboflavina, tiamina, α -tocoferol o ácido ascórbico, mientras que otras vitaminas, como el ácido retinoico puede ser empleado como un suplemento específico para ciertos cultivos (Van der Valk et. al, 2010)

Proteínas y péptidos: Se emplean como fuentes de aminoácidos en los medios libres de suero. Algunas de las principales proteínas añadidas son la albúmina y la transferrina que actúan como proteínas de unión a elementos como vitaminas, lípidos, hormonas y elementos traza, además la albúmina incrementa la viscosidad de los medios y protege a las células de daños mecánicos durante los procesos de aislamiento o centrifugación (Yang & Xiong, 2012)

Lípidos: Los lípidos y otros componentes relacionados cumplen diferentes roles en el cultivo celular, pueden ser empleados como componentes estructurales o reserva de energía y son añadidos para reducir la carga biosintética de su producción (Yao & Asayama, 2017). Se encuentran en el suero, y los de mayor abundancia son el palmitato y el oleato que pueden contribuir a la masa celular en los procesos de proliferación (Hosios et. al, 2016)

3. Criopreservación

Las células en cultivo pueden ser mantenidas en sistemas continuos por largos periodos, sin embargo, se corre el riesgo de generar inestabilidad genética por el envejecimiento de las líneas celulares, lo que puede provocar alteraciones en el fenotipo celular como pérdida de proteínas, antígenos de superficie o expresión de anticuerpos monoclonales, inestabilidad cromosómica y una consiguiente transformación a líneas finitas (Yokoyama Thompson & Ehrhardt, 2012). Los cultivos celulares continuos, además, están propensos a la contaminación por microorganismos y su mantenimiento implica costos más elevados. ya que el empleo de medios de cultivos enriquecidos es costoso. Como una alternativa para evitar dichos daños y costos se emplea la criopreservación celular.

La criopreservación es la conservación de muestras biológicas, ya sean suspensiones celulares o tejidos, a bajas temperaturas con la finalidad de mantener sus características funcionales por largos períodos. Dependiendo del tipo de muestra, estos pueden conservarse a -80°C , generalmente en ultracongeladores, o a -196°C , en tanques de nitrógeno líquido.

El almacén de muestras a -80°C suele ser empleado en muestras como bacterias o levaduras, ya que evita la proliferación celular, y puede ser conveniente en dicho tipo de organismos debido a que es más sencillo que mantener muestras en nitrógeno líquido. Sin

embargo, para otros tipos de muestras, la viabilidad se puede ver reducida a dichas temperaturas (Ozkavukcu & Erdemli, 2002).

La criopreservación en nitrógeno líquido mantiene una mejor calidad de las muestras, ya que, a temperaturas extremadamente bajas, el metabolismo celular se encuentra detenido, por lo que no se dan variaciones osmóticas ni reacciones enzimáticas que pueden generar moléculas dañinas como las especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que la fuente de daño en las muestras criopreservadas solo se atribuye a las radiaciones ionizantes que existen normalmente en la naturaleza, sin embargo, a pesar de ello no se ha reportado un incremento de mutaciones en células criopreservadas, ya que dicha radiación es bastante baja y además, los crioprotectores normalmente empleados muestran efectos radioprotectores (Ashwood-Smith & Friedman, 1979)

Fundamentos básicos de la criopreservación

Durante la criopreservación se producen eventos de reorganización de las moléculas de agua y solutos, que pueden causar alteraciones en las estructuras celulares, principalmente en la membrana o en los elementos proteicos que se ubican en ella por la presencia de los cristales de hielo que se forman cuando el agua se congela. Estos elementos pueden causar la disrupción de la membrana celular y el citoesqueleto, dañando irreversiblemente la célula (FAO, 2012). Dependiendo del protocolo de criopreservación, la tasa de congelamiento y descongelamiento, así como el ambiente celular (suspensión o tejido), dichas alteraciones pueden ser leves y permitir la supervivencia de las células, o pueden causar la muerte celular debido al criodaño (Zhmakin, 2008). Por ello, conocer los mecanismos básicos que se dan durante la criopreservación permite establecer estrategias para mejorar los protocolos empleados.

A grandes rasgos, con la disminución de la temperatura se inicia la formación de hielo extracelular en el medio, lo cual provoca un incremento en la concentración de solutos fuera de la célula. Una parte del medio, donde se ubican las células y los solutos permanece sin congelarse, la cual es conocida como fracción no congelada. Mientras una mayor cantidad de agua extracelular se congela, la fracción no congelada se reduce e incrementa la concentración de los componentes, lo que además induce la salida del agua intracelular por presión osmótica. Mientras reduce más la temperatura, la cantidad de agua intracelular se reduce, lo que evita la formación de hielo dentro de la célula y la fracción no congelada incrementa su viscosidad, por lo que la formación de cristales de hielo en dicha zona es poco probable, evitando así el daño de las células (Zhmakin, 2008).

En dichos procesos, la membrana celular es la barrera entre el medio extra e intracelular, por ello, además de mediar el transporte de moléculas hacia dentro y fuera de la célula, evita la formación de hielo intracelular cuando este se está formando en el medio extracelular. Normalmente, la membrana se encuentra en un estado conocido como líquido cristalino que puede alterarse a bajas temperaturas, ya que existe una estrecha interacción de las moléculas que constituyen la membrana (fosfolípidos, proteínas, carbohidratos) con las moléculas de agua, lo que determina la estructura de la membrana y su estabilidad (FAO, 2012).

En ese sentido, la membrana celular provee un acoplamiento mecánico entre la célula y su ambiente, mientras que las proteínas y/o azúcares asociadas a la membrana conforman canales iónicos, receptores y moléculas de señalización que difunden en la bicapa y se unen al citoesqueleto o matriz extracelular. Si algún componente se altera por la disminución de la temperatura, podrían iniciarse procesos que dependen de la estabilidad de las moléculas de membrana, como criocapacitación de espermatozoides,

diferenciación temprana de células madre o alteraciones en la expresión génica (Baust et. al., 2016)

La presencia de una membrana celular estable provoca que la salida del agua desde el interior de la célula sea lenta, por lo que existe la posibilidad de la formación del hielo dentro de la célula si la tasa de congelamiento no es la adecuada. Una tasa de congelamiento lenta podría mantener el equilibrio termodinámico del agua y evitar la formación de hielo intracelular, pero provocaría una deshidratación excesiva de la célula debido a la alta concentración de solutos en la fracción no congelada a la cual estaría sometida (Baust et. al, 2016, Zacà & Borini, 2017). Mientras que, con un enfriamiento rápido, el agua no tiene tiempo suficiente para salir de la célula provocando la formación de hielo dentro de ella, además podrían darse cambios en la forma, permeabilidad y estructura de la membrana debido al rápido flujo del agua. Por ello, es necesario la determinación de una tasa de congelamiento adecuada, de forma que se establezca el flujo adecuado de salida del agua intracelular, lo cual dependerá del volumen celular, área de la membrana, permeabilidad y ambiente celular (FAO, 2012, Mazur, Leibo & Chu, 1972, Woelders & Malva., 1998).

Un evento importante que se da en la criopreservación es el superenfriamiento. Este fenómeno se observa cuando un medio acuoso se enfría por debajo de su punto de congelamiento normal sin cambiar su estado de líquido a sólido (Ozkavukcu & Erdemli, 2002). En dichas condiciones, la nucleación del hielo, es decir el inicio de la cristalización, puede darse de forma espontánea a temperaturas no favorables lo que podría dañar a las células.

Por lo tanto, es importante que el inicio de la formación de hielo, o nucleación, se realice en condiciones controladas, proceso conocido como “seeding”, que consiste en enfriar la

muestra hasta temperaturas entre -5°C a -9°C , donde comúnmente se encuentra la temperatura de congelamiento de los medios de criopreservación. Las muestras se mantienen a dicha temperatura por unos minutos y luego inicia la nucleación mediante el contacto de la muestra, en pajillas o crioviales, con algún objeto metálico congelado o con trozos de algodón empapados en nitrógeno líquido (Ozkavukcu & Erdemli, 2002, Baust et. al., 2016)

Una vez iniciada la nucleación, la temperatura del medio retorna a la temperatura de congelamiento normal, para luego bajar a -7°C , después una tasa de congelamiento lenta permitirá la deshidratación de la célula y mantendrá el potencial químico del agua en equilibrio, lo que evita que el agua intracelular se congele mientras continúa la formación de los cristales de hielo en el medio extracelular. Esto sucede hasta llegar a una temperatura baja entre -30°C a -150°C , para luego pasar las muestras a temperaturas menores, generalmente en vapores de nitrógeno líquido, donde luego son sumergidos (Nagy, Varghese & Agarwal, 2017).

Crioprotectores empleados

Los crioprotectores cumplen la función principal de evitar la formación de hielo intracelular durante el congelamiento a través de diferentes estrategias. Por ejemplo, la presencia de los crioprotectores influye en la viscosidad y en las características fisicoquímicas del medio de criopreservación y de la fracción no congelada, interactúan con las moléculas de agua de forma que pueden provocar cambios en la forma, permeabilidad y fluidez de la membrana celular, así como en las características de algunas proteínas (Zhmakin, 2008).

El empleo adecuado de crioprotectores incrementa la tasa de supervivencia, pero si no son empleados a la concentración adecuada puede generar efectos tóxicos sobre las

células como denaturación de proteínas o desestabilización de membrana, así como inducción de apoptosis (Aliakbari et. al, 2016b).

La dinámica celular en presencia de los crioprotectores inicia con la pérdida del agua intracelular debido a la naturaleza hipertónica de los medios de criopreservación, lo que reduce la formación de hielo dentro de la célula, pero provoca que el volumen celular disminuya. Después de dicho encogimiento, la célula se hincha ya que los crioprotectores deben ingresar para restaurar el equilibrio osmótico, lo cual depende de la permeabilidad de la membrana hacia dichos componentes.

Según la habilidad de penetrar la membrana, los crioprotectores pueden clasificarse en permeables, como el propilenglicol (PG), etilenglicol (EG), glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), los cuales previenen la crenación de las células ya que permiten reducir la concentración de solutos electrolíticos (sales); y en crioprotectores no permeables, donde resaltan azúcares como sucrosa, trehalosa, manitol o lactosa, que incrementan la presión osmótica fuera de la célula e induce la salida de agua.

Los crioprotectores no permeables son empleados como solutos no electrolíticos en el medio, permiten establecer una presión osmótica que provoque la salida del agua, pero a su vez, es posible reducir la concentración de solutos electrolíticos, evitando así grandes deformaciones en la célula durante la criopreservación (Zhmakin, 2008). Además, los azúcares favorecen la estabilidad y previenen la denaturación de algunas macromoléculas; por ejemplo, la trehalosa y sucrosa sustituyen las moléculas de agua en las cabezas polares de los fosfolípidos de forma que estabilizan la membrana celular (Crowe et al., 1987, Anchordoguy et. al., 1987), y podrían actuar de forma similar con las moléculas de agua osmóticamente inactivas unidas a proteínas.

Por otro lado, los crioprotectores permeables como el glicerol, etilenglicol o el DMSO pueden ser empleados como solutos permeables. Estos reducen la presión osmótica de los medios, ya que debido a la mayor concentración de estos solutos fuera de la célula, el agua intracelular sale, pero al mismo tiempo, debido a su naturaleza permeable, estos crioprotectores ingresan, evitando así una mayor contracción de la célula. Además, este tipo de crioprotectores reemplazan el agua dentro y fuera de la célula, por lo que la cantidad de hielo formado es menor y la fracción no congelada incrementa, permitiendo una mayor conservación del volumen celular, así como la estabilidad de la concentración de solutos electrolíticos (Zhmakin, 2008)

De estos compuestos, el DMSO ha mostrado mayor eficiencia en la supervivencia postdescongelamiento. Su forma de acción se debería a la interacción electrostática de su extremo polar con los fosfolípidos de la membrana lo que permitiría mantener una mayor estabilidad; pero, además, actúa como un fuerte aceptor de puentes hidrógeno lo que le permitiría interactuar con el agua secuestrándola de los compartimentos celulares (Zhmakin, 2008)

Los medios de criopreservación suelen poseer una combinación de ambos tipos de crioprotectores, de forma que se optimicen sus efectos. Es ampliamente recomendado el empleo de azúcares, en especial la trehalosa y sucrosa en combinación con DMSO o glicerol, lo cual depende del tipo de célula que se emplea.

Además, los medios poseen sustancias como suero fetal bovino o albumina en medios de cultivo básicos, lo cual favorece el mantenimiento de las células y reduce el daño mecánico. Otros componentes adicionales pueden ser antioxidantes o proteínas como colágeno. Así mismo, algunos componentes naturales, como el té verde pueden ser añadidos a los medios ya que podrían contener componentes antioxidantes que protegen

a las células del estrés oxidativo (Zhmakin, 2008) o azúcares, de forma que añaden dichos compuestos al medio.

Optimización de protocolos de criopreservación

Un protocolo de criopreservación eficiente permite una alta supervivencia postdescongelamiento y, además, mantiene la funcionalidad de la muestra. Para lograr ello se deben considerar diversos factores, entre los que resaltan la tasa de congelamiento y descongelamiento por los motivos ya mencionadas, el manejo de las células, el método de criopreservación, así como la elección y concentración adecuada de los crioprotectores son algunos de los aspectos más importantes a evaluar (Aliakbari et. al, 2016b)

Para asegurar una mayor tasa de supervivencia después del descongelamiento de la muestra, es necesario mantener una concentración celular adecuada. Una alta densidad celular permite obtener un mayor número de células vivas postdescongelamiento, por ello se suelen emplear densidades de $1-5 \times 10^6$ células, lo cual es posible obtener mediante técnicas de enriquecimiento como centrifugación, filtración, o cultivos celulares que permiten la proliferación *in vitro* y el incremento de la densidad celular.

Algunos reportes indican que los cultivos celulares en la fase logarítmica de crecimiento celular son los más adecuados para los procesos de criopreservación, ya que las células se encuentran en un estado de crecimiento activo, con la mayor densidad celular y la mayor vitalidad (Yokoyama et. al., 2012).

Como ya se ha mencionado, la tasa de congelamiento adecuada permitirá reducir el criodañó por lo que su estandarización es vital. Se han propuesto tasas de congelamiento de células somáticas de mamífero de 1 a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ (Baust et. al., 2016), pero la tasa óptima es influenciada por factores como la concentración de crioprotectores y las características de las células (Mazur et.al., 1972). Así, por ejemplo, la tasa óptima de

congelamiento de los eritrocitos es de 3000°C/min, mientras que para los espermatozoides de toro es 1°C/min y para los embriones de ratón es 0.5°C/min (Zhmakin, 2008).

Una tasa de congelamiento controlada es importante para mejorar el protocolo de criopreservación, para lo cual, es común el empleo de dispositivos electrónicos junto a nitrógeno líquido, aunque ello incrementa el costo del proceso. En dichos dispositivos se pueden controlar las tasas de congelamiento en intervalos de temperatura establecidos, la temperatura y tiempo de seeding (Nagy et. al., 2017)

Finalmente, durante los procesos de congelamiento/descongelamiento, el volumen celular varía drásticamente, por lo que la estabilidad de la membrana se ve comprometida. Si la célula sufre un daño, se observa su muerte por necrosis poco después del descongelamiento, y en menor medida después de algunas horas (Baust et. al., 2016), por lo que el monitoreo adecuado de la calidad celular es necesario. El empleo de marcadores de apoptosis temprana y tardía pueden permitir una evaluación más adecuada de la funcionalidad de las células criopreservadas.

4. Células madre espermatogoniales (SSC)

Las células madre espermatogoniales son una subpoblación de las espermatogonias indiferenciadas, esenciales para la espermatogénesis y, por lo tanto, para la fertilidad masculina. Surgen de las células germinales primordiales o PGC (del inglés *Primordial Germ Cells*) durante el desarrollo embrionario, las cuales se ubican en las gónadas y dan lugar a los gonocitos o preespermatogonias, que luego se establecen como SSC en la membrana basal de los túbulos seminíferos (Lord & Oatley, 2017).

Estas se mantienen en un estado quiescente hasta el inicio de la madurez sexual, donde sufren una serie de cambios epigenéticos y se establecen en las poblaciones celulares que darán lugar a las espermatogonias indiferenciadas que comprenden a las SSC propiamente dichas y a un conjunto de espermatogonias más diferenciadas que darán inicio a la primera ronda de espermatozoides (Tseng et al, 2015, Lord & Oatley, 2017). A partir de ese momento, se promueven las primeras divisiones celulares mitóticas de las SSC, que permiten su autorenovación y la producción de células hijas, lo cual es conocido como la fase proliferativa de la espermatogénesis. En dicha etapa, las SSC producen dos células hijas, de las cuales una mantiene las características de su progenitora, mientras que la otra entra a la fase meiótica de la espermatogénesis, donde a través de un proceso de diferenciación se obtienen millones de espermatozoides durante la vida de un individuo macho adulto (Kanatsu-Shinohara et. al, 2016).

Características de las SSC

Una de las principales características de las SSC es su escasez. Estas se encuentran en baja proporción dentro de las diferentes poblaciones testiculares, puesto que constituyen aproximadamente entre el 0.01 al 0.03% de las células testiculares de un individuo adulto (Nagano, 2003). (Tabla 2)

Además, las SSC tienen el potencial para diferenciarse en células más especializadas que darán lugar al linaje espermatogénico en respuesta a diversos factores producidos por las células que componen el nicho de las SSC (Mutoji & Hermann, 2017). Esta característica se encuentra en equilibrio con la capacidad de autorenovación de las SSC, de forma que se mantiene una población constante a lo largo de la vida de un individuo.

Finalmente, como ya se mencionó, la autorenovación es la característica más importante de las SSC. Esta permite la existencia de células madre en las gónadas, de modo que se

mantenga la capacidad de producir espermatozoides a lo largo de la vida adulta, y es la que la diferencia de los otros tipos de espermatogonias más diferenciadas (algunas del Tipo A, intermediarias o Tipo B) ya que estas últimas también pueden producir espermatozoides, pero no son capaces de autorenovarse.

Tabla 2: Proporciones de las espermatogonias indiferenciadas o SSC (*) en algunas especies de interés.

Especie	Proporción	Referencia
Ratón	0.02-0.03%, 3.5×10^4 *	Takashima & Shinobara (2018), Tagelenbosch & Rooij (1993)
Bovino	18×10^4	Aponte et. al. (2008)
Humano	2%, 3×10^4	He et. al. (2010)

La naturaleza exacta de las células madre espermatogoniales aún no se ha definido debido a la falta de marcadores moleculares específicos de este tipo celular. Por concepto, se ha propuesto la caracterización de las SSC como pertenecientes a las espermatogonias indiferenciadas, las cuales engloban a las espermatogonias de tipo A, sin embargo, múltiples estudios han encontrado que los marcadores moleculares para las SSC también se pueden encontrar en las espermatogonias de tipo B o espermatogonias intermediarias, ya que estas podrían volver al estado de espermatogonias indiferenciadas (De Rooij, 2017a)

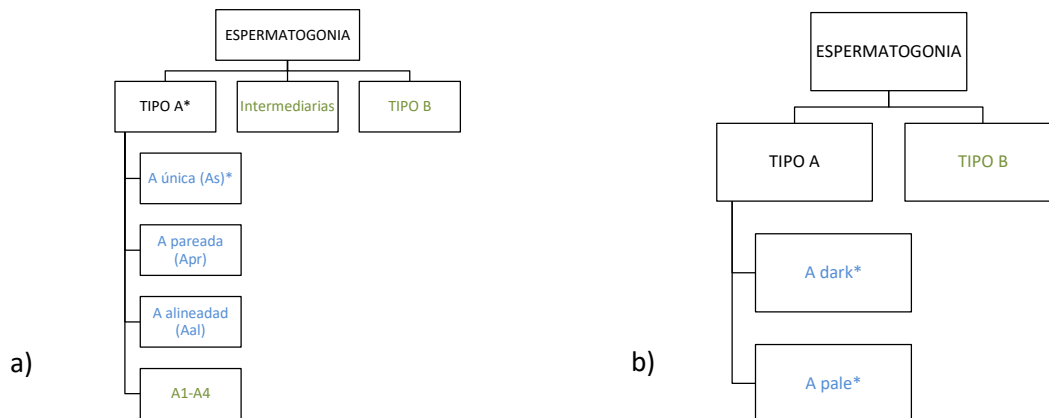


Figura 2: Clasificación de las células espermatogoniales de mamíferos no primates (a) y humano/primates (b). Los estudios en mamíferos no primates han sido realizados principalmente en ratón, toro y cerdo. Las SSC (*) se encuentran dentro de las espermatogonias indiferenciadas (azul), aunque ello es aún discutido ampliamente.

Nicho de las SSC

Las SSC se dividen en el estadio I del ciclo del epitelio seminífero y originan dos células hijas idénticas a su progenitora, sin embargo, estas no son idénticas molecularmente, debido a que una de ellas dará origen a una célula madre, mientras que la otra continuará con el proceso espermatoogénico al igual que la segunda célula hija de la primera célula madre. Esta división asimétrica podría deberse a que existen factores que promueven la proliferación y la diferenciación en una zona limitada del tejido testicular conocida como el nicho de SSC (Roosen-Runge, 1962).

El nicho de las SSC se ubica en la lámina basal, que es el espacio donde estas células se encuentran (Figura 1). Junto a ellas, se encuentran las células somáticas que como ya se mencionó, secretan diferentes factores que son importantes para el establecimiento del nicho de las SSC. Aquellos que influyen en los procesos de autorenovación han sido establecidos mediante sistemas de cultivo celular con medios de composición definida o cocultivos con células somáticas productoras de dichos factores (Kubota, et. al, 2004 a,b, Yomogida et. al, 2003, Hamidabadi & Bijnordi, 2017)

Uno de los factores más importantes es el Factor neurotrófico derivado de células gliales o GDNF (del inglés *Glial cell-derived neurotrophic factor*). Este factor promueve la proliferación y diferenciación de muchos tipos de neuronas en el sistema nervioso (Yomogida et. al, 2003) En el nicho de las SSC es producido por las células de Sertoli, actúa a través de sus receptores GFRA1 y c-RET presentes en las SSC (De Rooij, 2015) e influye en la expresión de factores de transcripción como Id4, Etv5 y Bcl6b a través de las vías Fosfatidilinositol 3 Kinasa- AKT y la vía protooncogénica RAS de forma que induce la autorenovación de las SSC e inhiben su diferenciación (Lord & Oatley, 2017, Takashima & Shinohara, 2018)

El Factor de crecimiento de fibroblastos 2 o FGF2 (del inglés *Fibroblast growth factor* 2) también es un factor que podría inducir la autorenovación de las SSC. Es producido por las células de Sertoli, Leydig y las propias células germinales (De Rooij, 2015) te factor actúa mediante la vía MAP2K1 a través de una regulación positiva de los factores de transcripción ETV5 y BCL6B (Ishii et. al., 2012)

Otro factor importante que se ha empleado en los cultivos celulares es el Factor de crecimiento epidermal o EGF (del inglés *Epidermal growth factor*) que, al igual que el FGF2, tiene un rol importante en la autorenovación de las SSC. Este actuaría de forma endocrina pero no sería esencial para la autorenovación, a diferencia del GDNF (Oatley & Brinster, 2012)

El Factor inhibidor de Leucemia o LIF (del inglés *Leukemia inhibitory factor*) ha sido empleado en cultivos como un factor involucrado en el mantenimiento de las SSC, aunque su rol se ha orientado más al establecimiento de las SSC a partir de gonocitos, por lo que estaría involucrado en el inicio de la proliferación celular. (Kanatsu-Shinohara et. al, 2007)

Definición del fenotipo de SSC

La definición del fenotipo de las SSC es importante ya que con la identificación de marcadores específicos de este tipo celular es posible purificar e incrementar su proporción dentro de las poblaciones de células testiculares aisladas para mejorar la eficiencia de los cultivos (Takashima & Shinohara, 2018). Esto también permite el monitoreo de las SSC durante el cultivo celular, de forma que se controle si estas aún mantienen sus características de SSC en condiciones *in vitro*, o si han comenzado el proceso de diferenciación (Lee W. Y. et. al, 2013).

Para el inicio de la identificación fenotípica se consideraron las características ya definidas de las SSC, su capacidad para autorenovarse y producir células diferenciadas (Ryu et. al, 2004). Ensayos funcionales combinando el trasplante de SSC y el empleo de marcadores de células madre ya establecidos empleados con técnicas como FACS o MACS han sido los más empleados para este objetivo.

Los primeros marcadores de SSC identificados en ratón fueron receptores de laminina ITGA6 e ITGB1, que permitieron el enriquecimiento de SSC hasta 8 veces (Shinohara, 1999). Los marcadores CD9⁺/ EPCAM permiten un enriquecimiento de la población de hasta 48 veces según algunos reportes (Takashima & Shinohara, 2018) Otros marcadores como MCAM y KIT, en conjunto con los marcadores anteriores enriquecen aún más la población observándose una frecuencia de 1 células madre cada seis células (Kanatsu-Shinohara et. al, 2012b)

Técnicas de evaluación de la expresión génica, como la qPCR también han sido empleados, donde se evalúan genes marcadores asociados a la pluripotencialidad como OCT4, NANOG o marcadores de células germinales indiferenciadas como PLZF y PGP

9.5, aunque su establecimiento como marcadores universales de SSC aún es controversial. (Kanatsu-Shinohara et. al., 2011, Lee W. Y. et. al, 2013)

Ello debido a que la expresión de los marcadores varía ampliamente entre especies y dentro de las especies en individuos de edades diferentes. Por ejemplo, en humanos se han identificado los marcadores de ratón como ITGA6, PLZF, UCHL1 (PGP 9.5) y THY1 (Guo et. al, 2013), aunque algunos marcadores como OCT4 o KIT no están presentes en las células germinales (He et. al., 2010)

En cuanto a los marcadores en otras especies, PGP 9.5 o UCHL1 (*Ubiquitin C-terminal Hydrolase 1*) es fuertemente expresado en SSC de cerdo y toro (Luo et. al, 2006). Estos se han empleado como base para evaluar nuevos marcadores como la lectina aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA), que ha mostrado eficiencia en el marcaje de las SSC en bovino (Herrid et. al, 2009). PLZF y THY1 son expresados en espermatogonias indiferenciadas de ratón, pero también se ha reportado su expresión conservada en células de porcinos, ovinos, bovinos y cabras (González, et. al., 2017). Al igual que en humano, la variación en el marcaje con dichos marcadores con la edad del animal del que se obtienen las muestras se discute ampliamente, por ello, a pesar que diferentes marcadores han sido propuestos, aún existe controversia en cuanto su uso general, por lo que es necesario la estandarización en cada especie.

Cultivo de SSC

Como ya se mencionó, las SSC se encuentran en muy baja proporción en los individuos adultos, por lo que el estudio detallado de su metabolismo es complicado. El cultivo de SSC ha cobrado importancia desde hace algunos años, debido a que permite el mantenimiento y la proliferación celular de dichas células, lo que facilitaría el estudio de

los mecanismos moleculares involucrados en la producción de gametos, y por ende un mayor conocimiento de la fertilidad masculina.

En animales que no se poseen líneas embrionarias establecidas, la obtención de líneas de SSC pueden permitir dilucidar las cuestiones básicas de la biología de células madres (Goel et. al, 2007). Además, ya que es posible emplear vectores para la modificación genética en células cultivadas, el establecimiento de cultivos de SSC también permitiría una mayor aplicación de dichas técnicas, así como una mejor evaluación a nivel molecular y bioquímico luego de las modificaciones (Takashima & Shinohara, 2018)

El cultivo celular, además, hace posible la aplicación de técnicas como el trasplante de SSCs. En especies como ratón y rata ya se ha aplicado dicha técnica y se ha observado una relativa eficiencia en la regeneración del potencial reproductivo, llegando incluso a la obtención de descendencia a partir de células transplantadas (Kanatsu-Shinohara et. al. 2003). Esto abre aún más posibilidades hacia las técnicas de manipulación genética con aplicaciones en mejoramiento genético animal, ya que la generación de líneas celulares mejoradas o transgénicas a partir de SSC permitirían generar gametos con las modificaciones establecidas y, eventualmente, producir animales transgénicos (Kanatsu-Shinohara, et. al., 2004, Kanatsu-Shinohara et. al, 2006)

Si bien las técnicas de aislamiento, purificación y cultivo de SSC son bastante efectivas en roedores, esto aún no se ha logrado en otras especies (Takashima & Shinohara, 2018). El objetivo principal de estas técnicas es enriquecer la población de SSC existente luego del aislamiento, separar las células testiculares que presenten características de SSC a través de marcadores específicos e incrementar el número mediante proliferación *in vitro*. Los cultivos largos en especies importantes como cerdo, toros, carneros y otros aún no están estandarizado por lo que es necesario más esfuerzos para lograr amplificar dicha

población, establecer líneas celulares y facilitar su empleo en el campo de la biología reproductiva.

Las SSC suelen obtenerse de los tejidos testiculares mediante dos digestiones enzimáticas. El proceso de aislamiento se puede realizar en medios básicos suplementados con antibióticos y enzimas para la disgregación de los túbulos seminíferos. Los medios más empleados son MEM, DMEM, HAMF12 o ambos, que suelen ser suplementados con SFB al 10- 15% y antibióticos.

Las enzimas más empleadas son Colagenasa, DNAsa y Hialuronidasa (Tabla 3), aunque algunos emplean también Tripsina (Goel et. al, 2007). Estas permiten la disgregación del tejido mediante su acción sobre proteínas de la matriz extracelular o reduciendo la viscosidad de las suspensiones celulares obtenidas. El tiempo de acción de las enzimas varía entre 20 a 45 minutos, pero para que actúen efectivamente, las células deben ser resuspendidas mediante pipeteo y estar en constante agitación.

Una vez obtenidas las suspensiones celulares, varios procesos de filtrado se emplean y, en algunos casos, se realizan purificaciones mediante suspensiones isosmóticas de Percoll (Goel et. al, 2007), que pueden permitir el enriquecimiento de las SSC. También se emplea el plaqueo diferencial o el enriquecimiento mediante técnicas como MACS o FACS.

Las células aisladas y purificadas son evaluadas para determinar la vitalidad y concentración celular. Los porcentajes de vitalidad son generalmente evaluados con azul de tripan y se encuentran entre 80-98% luego del proceso de aislamiento. Debido a que el aislamiento implica un procedimiento enzimático y físico, puede afectar la membrana celular y causar un daño que conlleva a la apoptosis, afectando así la vitalidad (Kim et.

al., 2015). En cuanto a la concentración, es necesario determinarla ya que se suelen cultivar densidades establecidas que varían entre 1×10^5 a 3×10^6 células.ml⁻¹.

Los medios de cultivo para la proliferación de SSC son medios compuestos como DMEM/F12 suplementados con antibióticos y hormonas en concentraciones establecidas. El cultivo se realiza generalmente a 37°C en presencia de CO₂ al 5% sin sistemas adicionales de buffer. (Tabla 3). En este tipo de medio, los factores de crecimiento son añadidos como parte del SFB, de forma que no se puede establecer su concentración, lo que dificulta la estandarización, por lo que algunos medios libres de suero suplementados con factores de crecimiento (GDNF, FGF y EGF) también han sido propuestos (Kanatsu-Shinohara et. al, 2005, Kubota et. al, 2004)

Los factores de crecimiento también son producidos por las propias células testiculares somáticas que se encuentran en las suspensiones celulares obtenidas luego del aislamiento. Algunos autores han reportado el cocultivo de las SSC con otras células testiculares, como las células de Sertoli, que contribuyen con factores de crecimiento que promueven la proliferación celular, como el GDNF (Hamidabadi & Bojnordi, 2017), o las células mioides peritubulares que producen CSF1 , que contribuye en la autorenovación de las SSC *in vitro* (Oatley et. al 2009). Por ello, es necesario establecer los mecanismos que controlan la autorenovación de las SSC y el rol que cumplen las células testiculares en dicho proceso con la finalidad de mejorar los sistemas de cultivo celular.

El tiempo de cultivo varía ampliamente en los estudios realizados. Se han reportado tiempos de duplicación de las SSC de 2.5 días *in vitro* (Takashima & Shinohara, 2018, Lee W. Y. et. al, 2013) y de 5.6 a 6 días dependiendo de la especie (Oatley & Brinster, 2006), pero en general los cultivos cortos suelen realizarse por hasta 7 días con

monitoreos cada 3 días, mientras que los cultivos largos se realizan entre 1-6 meses, aunque en ratón se han reportado cultivos de hasta un año.

Tabla 3: Medios de cultivo más empleados para el cultivo de SSC de diferentes especies.

Condiciones	Composición	Referencia
Animal: Cerdo Temperatura: 37°C con CO ₂ al 5% Cultivos cortos	Aislamiento: Colagenasa (1.5mg/ml) DNAsa (5µg/ml), Hialuronidasa (1.5mg/ml), Tripsina (0.5mg/ml) Cultivo: Medio DMEM/F12 suplementado con Insulina (10µg/ml), apotransferrina (10µg/ml), Penicilina (100 U/ml), Estreptomicina (50µg/ml), Gentamicina (40µg/ml), Aminoácidos no esenciales, Piruvato (1mM), SFB (10%).	Goel et. al 2007
Animal: Búfalo Temperatura: 37°C con CO ₂ al 5% Cultivos cortos	Aislamiento: Colagenasa (1.5 ml/ml), DNAsa (5 µg/ml), Penicilina- Estreptomicina (50 µg/ml), Gentamicina (40 mg/ml). Cultivo: Medio DMEM/F12 suplementado con Insulina (10 µg/ml), Apotransferrina (10 µg/ml), Penicilina (100 IU/ml), Estreptomicina (50 µg/ml). Sulfato de gentamicina (40 µg/ml) Solución de aminoácidos, Piruvato de sodio (1mol/L) y SFB (10%)	Goel et. al, 2010
Animal: Cerdo Temperatura: 31°C con CO ₂ al 5% Cultivos largos	Aislamiento: Colagenasa (0.5- 5.0 mg/ml), DNAsa (0.01mg/ml), Hialuronidasa (0.1 mg/ml). Cultivo: Medio parcialmente libre de suero STEMPRO 34 suplementado con: ITS (25 µg/ml- 100 µg/ml) Glucosa (6mg/ml), L-Glutamina (2mM), Aminoácidos no esenciales (1%), Solución de vitaminas (1%), Penicilina/Estreptomicina (100U/ml), Piruvato de Sodio (1mM), Vitamina C (0.1 mM), Ácido láctico (1 µg/ml), Estradiol (30 ng/ml), Progesterona (60ng/ml), SFB (0.2%), Reemplazo de suero KO (1%). Factores de crecimiento: mEGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml), GDNF (10ng/ml), LIF 10 ³ U/ml	Lee W. Y. et. al, 2013
Animal: Toro Temperatura: 37°C con CO ₂ al 5% Cultivos largos	Aislamiento: Colagenasa (2mg/ml), DNAsa (1mg/ml-5mg/ml), Hialuronidasa (2mg/ml) Tripsina (0.25%) Penicilina (100IU/ml), Estreptomicina (50mg/ml), Sulfato de gentamicina (40mg/ml), HEPES (15mM). Cultivo: Medio DMEM/F12 suplementado con: Insulina (10µg/ml), Apotransferrina (10 µg/ml), Penicilina (100UI/ml), Estreptomicina (50 µg/ml), Sulfato de gentamicina (40 µg/ml), Aminoácidos no esenciales, Piruvato (1mM), Lactato de Sodio (1.5 µl/ml 60%(w/v)), β mercaptoetanol (0.01mM), SFB (1% v/v). Factores de crecimiento: bFGF (20 ng/ml), GDNF (20ng/ml), EGF (50ng/ml)	Kim et. al, 2014
Animal: Ratón Temperatura: 37°C con CO ₂ al 5% Cultivos largos	Aislamiento: Colagenasa (1 mg/ml), Tripsina/EDTA 0.25%/1 mM EDTA Cultivo: Medio STEMPRO-34 suplementado con STEMPRO Supplement, Insulina (25µg/ml), Transferrina (100µg/ml), Putrescina (60µM), Selenito de Sodio (30nM), Glucosa (6mg/ml), Ácido pirúvico (30µg/ml), Ácido láctico (1µl/ml), BSA (5mg/ml), Glutamina (2mM), Mercaptoetanol (5x10 ⁻⁵ M), Vitamin Solution MEM, Aminoácidos no esenciales MEM, Ácido ascórbico (10 ⁻⁴ M), Biotina (10µg/ml), β-Estradiol (30ng/ml), Progesterona (60ng/ml). Factores: EGF 20ng/ml, FGF 10ng/ml, GDNF 10ng/ml, ESGRO 10 ³ U/ml	Kanatlsu-Shinohara et. al (2004)

Criopreservación de SSC

La criopreservación de las SSC surge debido a la necesidad de preservar líneas germinales por largos períodos fuera de un sistema de cultivo, ya que mantener las células puras en cultivos largos es complicado debido a las mutaciones espontáneas producidas en los procesos de replicación del ADN (Izadyar et. al., 2002b, Aliakbari et. al., 2016b).

La combinación del cultivo celular y la criopreservación de las SSC permitiría establecer líneas germinales puras por períodos indefinidos, aprovechando así la capacidad de estas células de regenerar la espermatogénesis y producir descendencia normal, incluso después de largos períodos de mantenerse en nitrógeno líquido (Wu et. al, 2012)

La preservación de las SSC permite el rescate de material genético importante de individuos que no producen espermatozoides, por lo que se puede preservar material reproductivo de interés de individuos jóvenes, de individuos que se ven afectados por factores exógenos que inhiben la producción de espermatozoides o de individuos que ya no producen gametos por su avanzada edad (González et. al, 2017).

Además, las SSC son células diploides que mantienen su potencial de recombinación para la generación de gametos haploides, por lo que mediante su preservación es posible albergar mayor diversidad genética de lo que se puede preservar mediante la criopreservación de espermatozoides (Kubota & Brinster, 2018). Una mayor diversidad genética incrementa la plasticidad de respuestas de las poblaciones frente a enfermedades, cambios climáticos, etc; que pueden verse reducidos por la endogamia derivada del empleo de bancos de espermatozoides.

El potencial de las SSC de autorenovarse y proliferar mediante cultivo celular se mantiene luego de procesos de criopreservación (Mirzapour et. al., 2013), lo que permite una mayor gama de aplicaciones frente a la criopreservación de semen que ha sido la técnica clásica

para la preservación de células germinales en diferentes especies, sobrellevando así la dificultad observada en el establecimiento de protocolos de criopreservación de semen, que deben ser estandarizados para cada especie, mientras que la criopreservación de las SSC se realiza con protocolos ya establecidos para células somáticas, con ligeras variaciones entre especies, lo que facilita su aplicación.

Las SSC se pueden criopreservar en forma de suspensiones celulares o se pueden criopreservar como parte del tejido testicular para su posterior aislamiento (Baert et. al., 2015). Ambas técnicas poseen ventajas y desventajas descritas en la Tabla 4. El método de criopreservación puede variar de acuerdo a cada tipo muestra, aunque el método de criopreservación lenta es el más empleado, con una reducción de la temperatura de 1°C/min de forma controlada o semicontrolada, debido a que este método reduce la formación de hielo intracelular y una deshidratación inadecuada (Kim et. al., 2015, Lee Y.A et. al, 2013).

Tabla 4: Tabla comparativa de los métodos de criopreservación de las SSC

Método de criopreservación	Ventajas	Desventajas
Suspensión de células testiculares	Empleo de protocolos de criopreservación ya establecido para células somáticas Posibilidad de criopreservar un mayor número de SSC luego de procesos de concentración o proliferación.	Pérdida de las interacciones células-células y del nicho de las SSC.
Tejido testicular	Preserva la interacción de las SSC con las otras células que componen su nicho, pudiendo incrementar su supervivencia y funcionalidad. Puede permitir la preservación de varios tipos celulares a la vez	Diferentes tipos celulares, con tamaño, complejidad y permeabilidad de membrana que responderán de diferente modo a los crioprotectores y el proceso de criopreservación. Necesidad de mayor conocimiento de los tipos celulares, interacciones, y estado de las células componentes del tejido a criopreservar, lo que incrementa la complejidad. Poco número de SSC es criopreservado en el tejido, debido a su número escaso.

El crioprotector más empleado en la criopreservación de las SSC ha sido el dimetilsulfoxido (DMSO), cuyo empleo ha permitido mayores tasas de supervivencia postdescongelamiento. Suele emplearse al 10% junto a medios básicos como MEM o DMEM suplementados con SFB al 10%. La adición del medio crioprotector a las muestras suele realizarse en volúmenes de 1:1 y a bajas temperaturas (Kim et. al., 2015)

Como ya se mencionó anteriormente, el empleo de azúcares como crioprotectores no permeables es recomendable. Resaltan la trehalosa y sucrosa, que incrementan la recuperación, viabilidad, capacidad proliferativa y eficiencia de colonización de espermatogonias indiferenciadas luego del descongelamiento en especies como ratón, cerdos y bovinos (Lee et. al, 2014a, Pan et. al., 2017, Lee et. al, 2014b, Kim et. al., 2015).

También se han suplementado los medios de criopreservación con aditivos como colágeno, laminina, y antioxidantes. Estos último pueden incrementar la supervivencia de las células, ya que el proceso de criopreservación puede generar especies reactivas de oxígeno, que pueden dañar estructuras celulares como la membrana o proteínas, lo que afecta la sensibilidad a los procesos de congelamiento/descongelamiento, o al ADN, lo que reduce la vitalidad de las SSC y su capacidad proliferativa (Aliakbari et. al, 2016a)

Si bien la vitalidad es uno de los parámetros básicos para evaluar la eficiencia de la criopreservación, la funcionalidad de las SSC debe ser también evaluada, lo cual se ha realizado mayormente mediante el trasplante de las células recuperadas luego del descongelamiento, donde se ha reportado la restauración de la espermatogénesis en individuos infértiles (Kanatsu-Shinohara et. al., 2003)

El establecimiento de un banco de germoplasma de diferentes especies de importancia económica, en peligro de extinción, silvestres o especies de importancia ecológica es posible mediante la criopreservación de gametos y de SSC, y junto a esta tecnología, la

proliferación de células germinales *in vitro* es fundamental para la aplicación de otras tecnologías reproductivas en dichas especies. El establecimiento de bancos de SSC permitiría la conservación de rasgos genéticos o genotipos que podrían luego ser incluidos en poblaciones separadas no solo espacialmente, sino también temporalmente (González et. al., 2017). Por otro lado, en alpacas se ha desarrollado protocolos de congelamiento termocontrolado en las SSC de alpaca en forma aislada y en forma de fragmentos testiculares, identificando la presencia de las SSC con DBA y estableciendo el mejor procedimiento para congelar las SSC en alpacas evaluando el potencial de actividad mitocondrial, apoptosis temprana y apoptosis mediante citometría de flujo (Valdivia 2018).

5. *Vicugna pacos*

Aspectos generales

La alpaca (*Vicugna pacos*) es una de las cuatro especies de camélidos sudamericanos existentes en el mundo. El guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) constituyen las especies silvestres, mientras que la alpaca, junto a la llama (*Lama glama*) constituyen las especies domesticadas. Estas pertenecen al orden Artiodactyla, suborden Tilopoda, familia Camelidae y tribu Lamini. Todos poseen un complemento cromosómico de 74 cromosomas y se han observado casos de cruces interespecies (Smith et. al, 1994)

Históricamente, la alpaca fue clasificada taxonómicamente como *Lama pacos*, de forma que se la agrupaba junto al guanaco y la llama, pero diferentes estudios donde se emplearon técnicas clásicas de citogenética, junto a la evaluación con marcadores moleculares, como el citocromo b y la región control del genoma mitocondrial, permitieron esclarecer la relación filogenética entre la alpaca y vicuña, siendo esta última

su ancestro silvestre directo, permitiendo así reclasificar a la alpaca como *Vicugna pacos* (Marin et. al, 2007)

Su población mundial se estima en más de 4 millones y el 87% de ellas (aproximadamente. 3 millones 800 mil alpacas) se encuentran principalmente en las zonas alto andinas del Perú (Gelman et. al, 1981; Bonacic, 1991; Quispe et. al 2009), el resto se ubica en países sudamericanos como Bolivia y Chile, donde se desarrollan en condiciones ambientales similares a las del Perú y se mantiene el mayor acervo genético; y en países como Australia, Canadá, Inglaterra, Francia y Estados Unidos, donde se mantienen en condiciones exclusivas para la producción de fibra de calidad o como animales de compañía (Lupton et. al, 2006)

En el Perú, la crianza de alpacas se realiza principalmente en los departamentos de Puno (35%), Cuzco (19%), Arequipa (14%) y Huancavelica (7%), donde son criadas a base de pastos naturales de forma extensiva y no prosperan otras especies de ganado (Sifuentes et. al, 2018). Las alpacas constituyen un importante elemento económico para los agricultores de dichas zonas, puesto que pueden mantenerse con relativa facilidad con la vegetación nativa, la cual es transformada en fibra de alta calidad y carne (Quispe et. al 2009). Además, es un importante elemento cultural de los pueblos altoandinos, puesto que su domesticación y crianza se remonta a diferentes culturas prehispánicas (Franklin, 1982)

Existen dos razas de alpaca en el Perú, Suri y Huacaya. La raza Suri se caracteriza por poseer un pelaje con mechones largos y rizados, y representa el 15% del total de la población de alpaca del Perú, mientras que la raza Huacaya posee un pelaje esponjoso y fino, es la raza más abundante en el país. A pesar de las diferencias fenotípicas de ambas razas, no se ha logrado establecer una divergencia genética a través de la evaluación

mediante marcadores moleculares, por lo que la riqueza alélica, y consiguiente diversidad genética, es bastante alta dentro de la población de la alpaca peruana (La Manna et. al, 2011, Renieri et. al, 2009)

Por otro lado, en el país, la población ganadera de alpacas se encuentra incrementándose de forma sostenida, así del 2007 al 2017, la población de alpacas ha incrementado en 1.7% por año. De forma similar, la producción de carne de alpaca a nivel nacional ha incrementado en un 2.3%, mientras que, a nivel internacional, la fibra de alpaca se posiciona como una de las más finas y solicitadas, representando el 11.9% en el mercado de los pelos finos, del cual más del 70% es fibra de alpaca peruana (MINAGRI, 2017).

La industria textil produce una mayor demanda de la fibra de color blanco, por lo que se realiza una selección artificial de este color dentro del ganado alpaquero (La Manna et. al, 2011). Así, estudios de la fibra de alpaca en EEUU realizados por Lupton, et. al. (2006) registran diferentes colores de fibra de la raza Huacaya, donde el color blanco natural representa el mayor porcentaje dentro de la población evaluada. Condori A. (2014) menciona diferentes estudios de la estructura poblacional y variabilidad fenotípica de alpacas en el Perú, donde se observa una alta frecuencia del color blanco en el ganado, siendo en algunos casos superior al 70%.

Dicha selección artificial realizada por los pobladores disminuye drásticamente la variabilidad genética de esta especie (Montes et. al., 2013), y puede provocar diferentes consecuencias como pérdida de diversidad genética, erosión genética, disminución de la calidad de fibra e incremento de malformaciones debido a la endogamia.

Aspectos reproductivos

Los camélidos sudamericanos exhiben varias características reproductivas fisiológicas distintivas, por ejemplo, el sistema reproductor de la alpaca masculina presenta peculiaridades anatómicas y fisiológicas, en algunos casos desfavorables como una pubertad o tiempo para alcanzar la madurez sexual variable, la desaceleración del crecimiento testicular, alta incidencia de anomalías testiculares, baja concentración de espermatozoides, y una pobre fertilidad en comparación con otras especies domésticas. Por ello, comprender estas peculiaridades; afectadas por factores como la genética, la nutrición, los cambios climáticos y la estación de nacimiento es un requisito previo para permitir la realización de un examen minucioso de los machos adultos durante las investigaciones de infertilidad (Tibary & Vaughan, 2006)

La espermatogénesis en *Vicugna pacos* es similar a la descrita para otras especies de camélidos (Tibary & Ruiz, 2018, Casas et al., 1966, Tibary & Memon, 1999). El ciclo del epitelio seminífero consta de ocho etapas y cada sección transversal muestra una única etapa del ciclo (Tibary & Vaughan, 2006). A su vez, la espermiogénesis en camélidos está compuesta de doce fases, que se superponen en cada etapa del ciclo seminífero, sin embargo, esto puede variar en la alpaca, debido a que la organización del ciclo seminífero y espermiogénesis es muchas veces especie específico (Delhon & Von Lawzewitsch, 1987)

En los camélidos sudamericanos, las poblaciones de espermatogonias también son clasificadas de acuerdo a su forma nuclear y arreglo cromatínico. Así, Delhon & Von Lawzewitsch (1987) clasificaron a las espermatogonias de llama en dos tipos: Las espermatogonias de tipo A poseen núcleos que van desde circulares a ovoides y una cromatina granular fina, encuentra en todos los estados del ciclo seminífero en la lámina basal del epitelio seminífero, junto a las células de Sertoli e incrementan durante las

primeras etapas. Las espermatogonias de tipo B poseen un núcleo más pequeño y la cromatina está organizada en paquetes que rodean la membrana nuclear o se encuentran libres en el nucleoplasma, se ubican junto a las espermatogonias de tipo A en el epitelio seminífero, su número incrementa en las etapas tardías del ciclo seminífero y son estas las que dan origen a los espermátocitos, espermátidas y espermatozoides.

En alpaca, la producción de espermatozoides se correlaciona con el tamaño testicular, por lo que dicho parámetro puede utilizarse como un medio simple para estimar la probabilidad de producción de espermatozoides en alpacas (Galloway, 2000). Sin embargo, el proceso de espermatogénesis y la producción de esperma en términos de series poblacionales de tipos celulares que se da en los túbulos seminíferos y la regulación de la producción de espermatozoides en términos de genes que son expresados por células germinales y somáticas permanecen aún poco estudiada (Tibary & Vaughan, 2006)

Aplicación de Biotecnologías reproductivas

Las investigaciones actuales en las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos se centran en la adaptación de las técnicas desarrolladas para la conservación del material genético de los animales mediante la criopreservación de células germinales, como espermatozoides y ovocitos, inseminación artificial, maduración ovocitaria *in vitro* y criopreservación tejidos reproductivos.

La conservación mediante la criopreservación de espermatozoides es la alternativa más sencilla, sin embargo, en los estudios en camélidos se ha reportado una disminución de los parámetros de calidad espermática y, por ende, menor capacidad fecundante después del descongelamiento (Bravo, Skidmore & Zhao, 2000; Santiani et. al, 2005), lo que indica que los espermatozoides de los camélidos sufren daños considerables durante la

criopreservación con los protocolos utilizados por lo que no constituyen una alternativa adecuada para conservar la fertilidad de estas especies.

Por otro lado, la criopreservación de los tejidos testiculares es un medio potencial para preservar el material genético, puesto que permite preservar la integridad celular y las funciones endocrinas de los testículos, permitiendo la conservación y posterior empleo de las SSC y espermatozoides. Mientras que la criopreservación de las SSC permite la conservación de un mayor número de células que mantienen su potencial para generar gametos, son el único tipo celular que contribuye con información genética para la siguiente generación, mantienen en mayor medida la diversidad genética ya que tienen potencial para recombinación genética, e incluso pueden generar otros tipos celulares mediante procesos de desdiferenciación, por lo que este tipo celular es esencial para la preservación de una especie y su diversidad genética (Oatley & Brinster, 2006).

Como ya se ha descrito, diversos estudios en humanos y en otros animales de importancia económica han mostrado que la proliferación y consiguiente enriquecimiento de las SSC incrementa la capacidad de conservar y restaurar la fertilidad (Mirzapour et. al 2013, Lee W. Y. et. al 2013), así como el desarrollo de aplicaciones prácticas como la conservación de líneas germinales y producción de transgénicos (Kim et. al, 2015)

Es por ello que los recientes avances en las biotecnologías reproductivas en camélidos incluyen la mejora de los métodos de criopreservación de este tipo celular donde se comparan diferentes métodos, como la criopreservación de células aisladas o tejidos testiculares con el uso de diferentes crioprotectores como un primer paso para el rescate de material genético en esta especie tan importantes para el Perú (Valdivia et. al, 2015)

Considerando lo anteriormente expuesto, en esta tesis se propone el empleo de las técnicas de cultivo y criopreservación de las SSC con la finalidad de mejorar las biotecnologías reproductivas para el rescate del material genético de la alpaca peruana.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La mayor población de alpacas del mundo se encuentra en las regiones altoandinas del Perú, por lo que su manejo y crianza es especialmente importante en nuestro país debido a sus contribuciones a las economías locales. Estos animales proporcionan carne, lana, combustible, transporte de bienes y constituyen un elemento de identidad cultural.

Los estudios en técnicas de biotecnología reproductiva han sido poco alentadores en los camélidos sudamericanos, debido a sus características reproductivas. La inseminación artificial y la criopreservación de semen aún no han podido ser estandarizados, por lo tanto, existe la necesidad urgente de desarrollar técnicas que abarquen el estudio de la biología reproductiva de estas especies desde otro ángulo, como el empleo de células madre espermátogoniales, de forma que se pueda realizar el manejo del material genético para su mejoramiento y conservación.

El desarrollo de dichas tecnologías dará lugar a enfoques rápidos y eficaces para apoyar la viabilidad de la producción animal, para propagar y preservar la genética superior y aumentar la disponibilidad de mejores ejemplares a los criadores. Para la industria de la alpaca esto podría potencialmente mejorar la fibra, la fertilidad y la resistencia a enfermedades en la descendencia.

PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN

1. Problema general

¿El cultivo celular previo a la criopreservación de SSC mejora la preservación de SSC de alpaca?

2. Problemas específicos

¿De qué forma se pueden aislar SSC de alpaca macho?

¿Cómo proliferar SSC?

¿Existe alguna diferencia entre la calidad de SSC proliferadas y no proliferadas luego del descongelamiento?

FORMULACIÓN DE OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Objetivo general

Comparar la calidad posdescongelamiento entre las SSC proliferadas y no proliferadas en alpaca (*Vicugna pacos*)

2. Objetivos específicos

- Proliferar las SSC aisladas mediante cultivo *in vitro*.
- Criopreservar las SSC aisladas proliferadas y no proliferadas.

HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

1. Hipótesis.-

La criopreservación de células madre espermatogoniales (SSC) de alpaca (*Vicugna pacos*) luego de un cultivo mejora su preservación frente a la criopreservación de células sin cultivo previo.

2. Variables de la Investigación. -

Variable independiente:

Criopreservación de células madre espermatogoniales (SSC).

Cultivo de células madre espermatogoniales (SSC).

Variable dependiente:

Porcentaje de SSC en Apoptosis

Porcentaje de SSC en Apoptosis temprana

Porcentaje de SSC con Potencial mitocondrial activo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Material biológico:

Testículos de alpacas adultas (boca llena) sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica, las cuales se evaluaron en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción (LFR) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) UNMSM en Lima, luego de 22-24 horas del sacrificio del animal. Las muestras fueron transportadas en suero fisiológico a 4°C. Los donadores fueron alpacas empleadas para la obtención de carne y materia prima. Debido a que en la ciudad de Lima no se tienen registros de estos animales criados de forma intensiva como en las poblaciones altoandinas, se emplean las muestras provenientes de dicha zona, además, ya que se trata de un establecimiento municipal, se cuenta con las condiciones sanitarias adecuadas que permitan la obtención de muestras para la estandarización de los protocolos desarrollados en el LFR.

Material de laboratorio:

Reactivos de aislamiento y cultivo celular

Medio de aislamiento celular: Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich, cat. no. M4655) suplementado con Penicilina al 10% (5.8 µg/ul) (Sigma-Aldrich, cat. no. P3032) y Sulfato de Estreptomicina (1mg/ml) (Sigma-Aldrich, cat. no. S1277)

Medio de digestión enzimática: Medio de aislamiento suplementado con Enzimas de digestión Hialuronidasa, 0.5 mg/ml (Sigma-Aldrich, cat. no. H3506), Colagenasa, 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, cat. no. C9263) y DNAasa, 2,6ul/ml (Sigma-Aldrich, cat. no. D4527) (Enzima 1) y Hialuronidasa, 0.5 mg/ml y Colagenasa, 1 mg/ml (Enzima 2)

Medio de cultivo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [1X] (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, cat. no. 11965) o STEMPRO™-34 SFM [1X] (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, cat. no. 10640) suplementados de acuerdo al Anexo 1.

Reactivos de evaluación de concentración y vitalidad celular

Suero para lavado de muestras testiculares: NaCl 0.9%, Penicilina al 10% (5.8 µg/ul) y Sulfato de Estreptomicina (10mg/ml)

PBS: NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L a pH 7.4

Buffer Dulbecco: Buffer Fosfatado Salino Dulbecco's (Sigma-Aldrich, cat. no.D5773) 9.6%, CaCl₂ 100mg/L, Penicilina 0.075g, Estreptomicina 0.075g, Heparina 2cc

Azul de tripán (Sigma-Aldrich, cat. no. T6146) al 0.4%

Reactivos para criopreservación de suspensiones celulares

Medio de criopreservación CRIO 14-UNMSM estandarizado en el LFR (Valdivia, 2018)

Reactivos para la evaluación del número y calidad de las células mediante citometría de flujo

DBA-FITC (EY Laboratories, cat. no.F-1201-5)

Kit FlowCollect MitoPotential Red (MERCK Millipore, cat. no. FCCH100105)

Material de vidrio y plástico

Placas de cultivo de 12 pocillos (SPL Life Science), crioviales de 2ml (CAPP, cat. no. 504200C), hemocitómetro 0.025mm² (Marienfield), láminas y laminillas

Equipos y softwares

Incubadora de CO₂ Forma Series II (Thermo Scientific), Centrifuga 5424-R de 24 tubos (Eppendorf), Equipo Minirotador de tubos Bio RS-24 (BioSan), Microscopio invertido, Citómetro de flujo, Equipo para criopreservación FreezeControl CL-3300, Software para Criopreservación Cryogenesis IV, Cámara de flujo laminar Labconco, Autoclave, Balanza electrónica, Tanques de nitrógeno líquido, Refrigeradores.

Instrumentos para aislamiento

Bisturí, Tijeras y Pinzas, Micropipetas Eppendorf de 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

Consumibles

Tips de micropipetas Eppendorf, Guantes, Papel toalla

Métodos

Protocolo de Aislamiento de Células Madre Espermatogoniales (SSC)

Por fecha de procesamiento, se obtuvieron aproximadamente 8 muestras de biopsias testiculares de Alpaca (*Vicugna pacos*) adulta del departamento de Huancavelica, de las cuales se seleccionarán de 3-7 pares de testículos con mayor peso promedio testicular (PPT), concentración (CE) y movilidad (ME) de espermatozoides epididimarios, los cuales se evaluaron de acuerdo al Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud (OMS) o WHO (del inglés *World Health Organization*). vigente (WHO, 2010)

Luego del pesaje de cada testículo, estos fueron lavados con suero y antibióticos y colocados en la cámara de flujo laminar, donde fueron procesadas todas las muestras para mantener la esterilidad. Cada muestra de cada animal fue trabajada independientemente, se emplearon juegos de materiales estériles para cada animal y todos los utensilios fueron

rotulados con el código del animal. Se obtuvieron 3 trozos de tejido de un testículo por animal de aproximadamente 0.8g cada uno que fueron triturados con tijeras finas y, a través de una malla metálica se obtuvo una suspensión celular con medio de aislamiento. Al final de dicho proceso se obtuvieron 3 tubos eppendorf de 1ml por animal.

Se realizó una centrifugación y un lavado con el mismo medio en una centrífuga temperada a 37°C, 4000rpm durante 5 y 10 minutos respectivamente. Todas las centrifugaciones y lavados se realizaron a las mismas condiciones.

Luego de los lavados, las células testiculares agrupadas en un pellet fueron tratadas con 2 digestiones enzimáticas con Hialuronidasa, Colagenasa y DNAasa en las concentraciones ya establecidas y resuspendidas suavemente. Las digestiones enzimáticas se realizaron a 37°C y en la incubadora de CO₂ por 30 y 20 minutos respectivamente, las muestras fueron colocadas en un rotador de células para permitir una mayor acción de las enzimas. Luego de cada digestión se realizó una centrifugación y un lavado con el medio de aislamiento en las condiciones ya mencionadas. Las células testiculares aisladas de cada animal fueron resuspendidas en 2ml de medio de aislamiento, llegando a un total de aproximadamente 2.5ml debido al volumen de las células. Dicha suspensión será denominada de ahora en adelante como Suspensión Celular Inicial (SCI), la cual se obtuvo por cada animal.

De cada SCI se extrajo una alícuota de 10 µl que se resuspendió en 990 µl de PBS o Buffer Dulbecco's para realizar la determinación de su concentración en el hemocitómetro. Al mismo tiempo, se extrajo una alícuota de 20 µl para la evaluación de la vitalidad con azul de Tripán, para ello las muestras se mantuvieron a 37°C en todo momento, se colocó 10 µl de muestra en una lámina previamente temperada y se añadieron 2 µl de Azul de tripán temperado, se colocó una laminilla y se observó al microscopio con un aumento de 400,

se registró en video para reducir el tiempo de las SCI fuera de la incubadora y evitar mayores variaciones por el cambio de temperatura.

Una vez determinada la concentración celular, las muestras fueron empleadas de la siguiente forma:

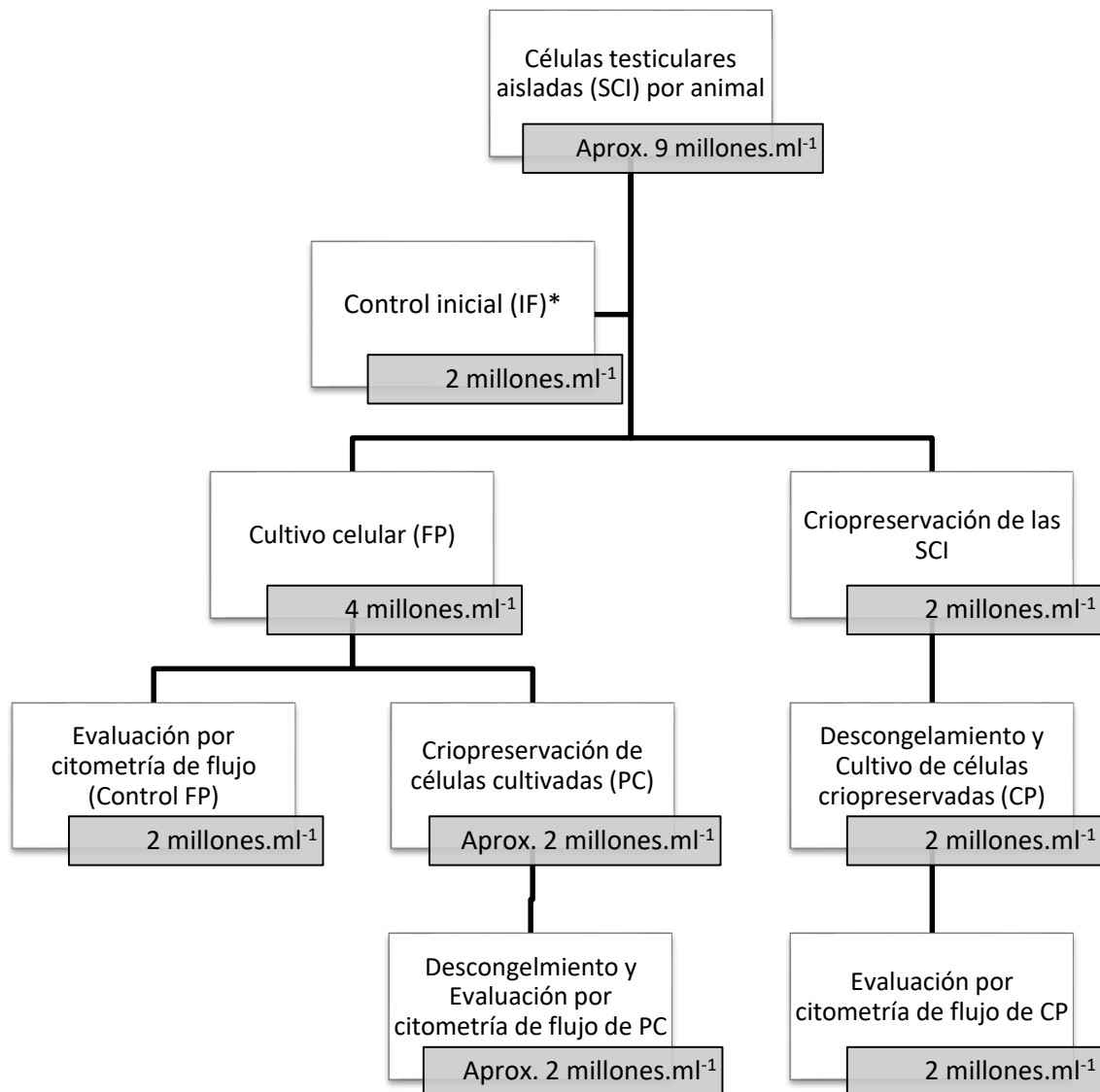


Figura 3: Flujograma realizado en el presente trabajo. *Células fijadas (n=6)

Una alícuota de las SCI de cada animal (n=6) fue fijada y se emplearon como controles iniciales del número y porcentaje de SSC ante de la proliferación celular. Para ello, las muestras se lavaron dos veces con PBS 1X suplementado con BSA al 0.1% y luego se le

añadió metanol frío al 80% (en la misma solución de lavado), se incubaron las células durante 15 minutos a 4°C y luego se realizó una centrifugación y un lavado a 4°C y 4000rpm. Las muestras fueron rotuladas y almacenadas a 4°C por una semana y luego se procedió a su marcaje con DBA-FITC para su lectura en el citómetro de flujo como se detalla más adelante.

Cultivo y proliferación de células madre espermato goniales *In vitro*

Las SCI de cada animal, que contienen células madre espermato goniales, además de otras células del linaje espermático y células somáticas, fueron cultivadas en 2 ml de medio de cultivo (DMEM o STEM PRO) a una densidad celular de 1 millón.ml⁻¹ en placas de cultivo de 12 pocillos. Los pocillos donde se cultivaron las alícuotas de un mismo animal se colocaron en la misma placa de cultivo. Todos los cultivos se realizaron a 37°C en una incubadora de atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. La proliferación de las células madre espermato goniales se estimuló mediante la suplementación del medio con factores de crecimiento GDNF, FGF, EGF y LIF tal como se detalló en el Anexo 1.

El seguimiento de los cultivos se realizó con el uso de un microscopio invertido cada 4 días. Se fotografiaron las placas de cultivos y se evaluó posibles contaminaciones. Los cultivos se realizaron por 15 a 22 días, lo cual dependió de la apariencia del cultivo, considerándose apariencia de las células y proliferación estimada. Estas muestras fueron denominadas Frescas Proliferadas o FP, las cuales se evaluaron mediante citometría de flujo o fueron criopreservadas para luego ser evaluadas como se detalla más adelante (Figura 3)

Criopreservación y descongelamiento de células testiculares cultivadas y no cultivadas

Las SCI y las FP fueron criopreservadas mediante el siguiente protocolo. Cada muestra fue resuspendida en medio de aislamiento y dicha suspensión fue añadida al medio de criopreservación de acuerdo a Valdivia (2018), en un criovial de 2ml de capacidad en una proporción 1:1. Los crioviales fueron colocados en una bolsa plástica y sumergidas en un beaker con agua potable, todo el sistema se colocó a 4°C por una hora para su estabilización y posteriormente, las muestras se sometieron a un congelamiento lento termocontrolado en el Equipo FreezeControl CL-3300 usando el Sistema Cryogenesis IV bajo el protocolo de criopreservación del laboratorio de Fisiología de la Reproducción (Valdivia, 2018). Una vez terminado el protocolo, las muestras se colocaron en vapores de nitrógeno líquido por aproximadamente 18 horas y luego fueron sumergidas en nitrógeno líquido hasta su descongelamiento.

El descongelamiento de las células se realizó luego de 1 a 4 semanas del congelamiento (Anexo 1). Los crioviales fueron colocados en una caja termoaislante de tecnopor (previamente enfriadas a 4°C) cerradas por 5 minutos a temperatura ambiente (18-21°C). Luego, la caja termoaislante cerrada con los crioviales en su interior fue colocada en una incubadora a 37°C por 5 minutos más, y finalmente la caja fue abierta y los crioviales se mantuvieron a 37°C hasta que se observara el descongelamiento de las muestras. Una vez que las muestras se observaran líquidas, se colocó todo el contenido del criovial en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron las muestras para retirar los crioprotectores y luego se realizó un lavado con medio de cultivo.

Finalmente, las muestras se resuspendieron en medio de cultivo y se procedieron con los procesos correspondientes (Figura 3). Las FP criopreservadas fueron descongeladas para la evaluación del porcentaje de SSC y su calidad mediante citometría de flujo, y fueron

denominadas Proliferadas Criopreservadas o PC. Las SCI fueron descongeladas para su cultivo y proliferación *in vitro* a las mismas condiciones a las que fueron cultivadas las SCI correspondientes, estas fueron denominadas Criopreservadas Proliferadas o CP.

Evaluación mediante citometría de flujo

Luego de obtener las suspensiones celulares correspondientes (FP, CP y PC), se procedió a retirar el medio de cultivo mediante una centrifugación. Las muestras fueron lavadas dos veces con Buffer Dulbecco's suplementado con BSA al 0.1%, y después del segundo lavado se resuspendieron en buffer Dulbecco's y el colorante fluorescente catiónica Mitosense Red (0.02 µl/ml) en una proporción 1:1, se añadió 1 µl/2x10⁶ células del conjugado DBA-FITC y se procedió a incubar las muestras por 15 minutos a 37°C y en oscuridad.

Luego de la incubación se realizaron dos lavados con el buffer Dulbecco's, se resuspendieron las células en un volumen final de 200 µl. Las muestras fueron colocadas en una incubadora portátil de forma que se mantuvieran a 37°C mientras se trasladaban al laboratorio de Citometría de Flujo de la Facultad de Medicina Veterinaria (UNMSM). Posteriormente en el laboratorio, se añadió 5 µl de la sonda 7AAD a cada muestra y luego se procedió a realizar su lectura con el citómetro de flujo. Se realizó una lectura de 30000 eventos y cada fluorocromo fue evaluado con un canal diferente.

Los marcadores empleados marcaron los siguiente:

DBA-FITC : SSC y SSC en diferenciación temprana (ED)

Mitosense : Células con Potencial Mitocondrial Activo (PMA)

7-AAD : Células en Apoptosis Temprana o Apoptosis (EA y A)

Al inicio del experimento se realizó la compensación de los fluorocromos y cada semana se realizó la calibración del citómetro de flujo realizada por el personal técnico del LCF.

Análisis estadístico

Se realizó la evaluación de los estadísticos descriptivos de los parámetros PPT, CE, ME, VI, CC, así como del porcentaje de SSC, células con PMA, EA y A. Se evaluó la normalidad de dichos parámetros con la prueba de Shapiro-Wilk. Para determinar la variación de los parámetros de SSC (%SSC, PMA, EA y A) en base al medio de cultivo empleado se realizó la prueba T para los parámetros que presentaron una distribución normal y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para aquellos que no. Para evaluar la variación de los parámetros entre los diferentes tipos de muestra (FP, CP y PC) se empleó la prueba T para muestras relacionadas en aquellos parámetros que mostraron distribución normal y la Prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas en aquellos que no presentaron distribución normal. El nivel de significancia fue de 0.05 en todas las pruebas. Adicionalmente se evaluó la correlación de los parámetros PPT, CE, ME, VC y CC de todas las muestras.

RESULTADOS

Parámetros iniciales de las muestras testiculares

Se emplearon 23 muestras de biopsias testiculares provenientes del camal municipal de Huancavelica. La recolección de las biopsias se realizó entre las 8 de la mañana y las 3 de la tarde del día anterior a la llegada al laboratorio de Fisiología de la Reproducción en la ciudad de Lima. Durante ese intervalo, las muestras se mantuvieron en suero fisiológico en cajas de tecnopor con gel packs a una temperatura aproximada de 4°C. La llegada de las muestras al LFR fue entre las 7 y 8 de la mañana, el procesamiento comenzó al instante de su llegada. Se procesaron entre 3 a 7 muestras por fecha, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo al Peso Promedio Testicular (PPT), Concentración de espermatozoides epididimarios en millones.ml⁻¹(CE), Movilidad de espermatozoides epididimarios (ME) y además se registraron datos adicionales como la Apariencia Física (AF) (color y consistencia) (Anexo 2).

Se observó una alta variabilidad entre los parámetros evaluados. El parámetro PPT mostró un promedio de 12.29 ± 0.77 , mientras que los parámetros CE y ME mostraron valores promedios de 231 ± 28.04 y 32.27 ± 3.96 respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5: Valores promedio de los parámetros iniciales evaluados (n=23)

Estadísticos descriptivos	Peso promedio testicular (PPT)	Concentración espermática (CE)	Movilidad espermática (ME)
Promedio	12.29 ± 0.77	231 ± 28.04	32.27 ± 3.96
Mínimo	5.43	66	2.26
Máximo	21.34	632	60.57

Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación entre los valores de PPT y CE, pero los índices de correlación encontrados fueron bajos y no significativos, por lo que no se pudo establecer una correlación entre dichos parámetros (Figura 4)

Vitalidad y concentración de las suspensiones de células testiculares

Luego del aislamiento celular se evaluó la vitalidad (VI) y concentración (CC) de las células testiculares (SCI). La Tabla 6 y los Anexos 4 y 5 muestran los valores de vitalidad observados luego de 24 horas del sacrificio de los animales.

Se encontró una variación alta entre las muestras (Figura 2), con un valor mínimo de 42.2% y un máximo de 85.5%, y un valor promedio de $70.74\% \pm 2.13$ de células vivas, establecidas en base al conteo de más de 100 células (Anexo 2). La concentración se estableció como millones de células testiculares en un mililitro de suspensión celular (millones.ml^{-1}). De la misma forma que en el parámetro de vitalidad, se encontraron valores variables, con un mínimo de 7 millones. ml^{-1} y un máximo de 41 millones. ml^{-1} , y un valor promedio de 19.04 ± 2.05 millones. ml^{-1} .

Tabla 6: Valores de vitalidad y concentración de las SCI luego del aislamiento enzimático (n=23)

Estadísticos descriptivos	Vitalidad celular (VC)	Concentración celular (CE)
Promedio	$70.74\% \pm 2.13$	19.04 ± 2.05 millones. ml^{-1}
Mínimo	42.2%	7 millones. ml^{-1}
Máximo	85.5%,	41 millones. ml^{-1}



Figura 4: Porcentaje de vitalidad de las SCI de todas las muestras empleadas y el valor promedio (70.74%)

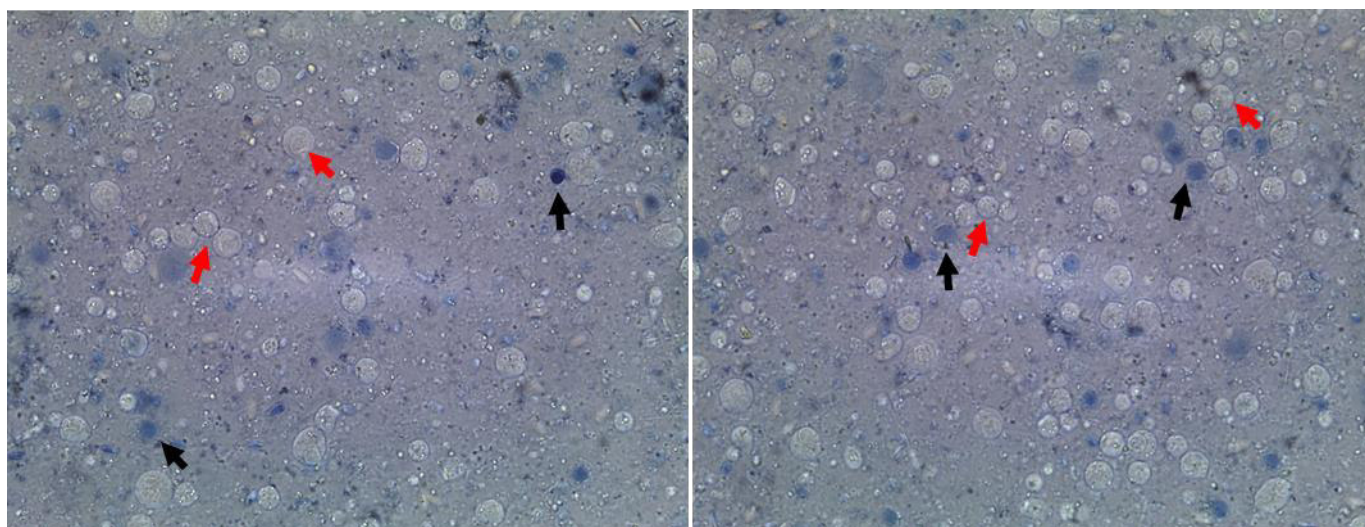


Figura 5: Evaluación de la vitalidad con azul de Tripán de las células testiculares después del proceso de aislamiento enzimático. Se observan la tinción diferencial de las células vivas (transparentes, flechas rojas) y las muertas (azules, flechas negras).

Se analizó la relación entre los parámetros ME y VI, así como CE y CC con la finalidad de poder validar la relación de la movilidad y concentración espermática con la vitalidad y concentración de las células testiculares (Figura 4), sin embargo, no se encontró correlación significativa entre ninguno de los parámetros ($p>0.05$), por lo que no es posible asegurar que los parámetros iniciales de movilidad y concentración de espermatozoides epididimarios puedan permitir una extrapolación sobre la vitalidad y concentración de las células testiculares.

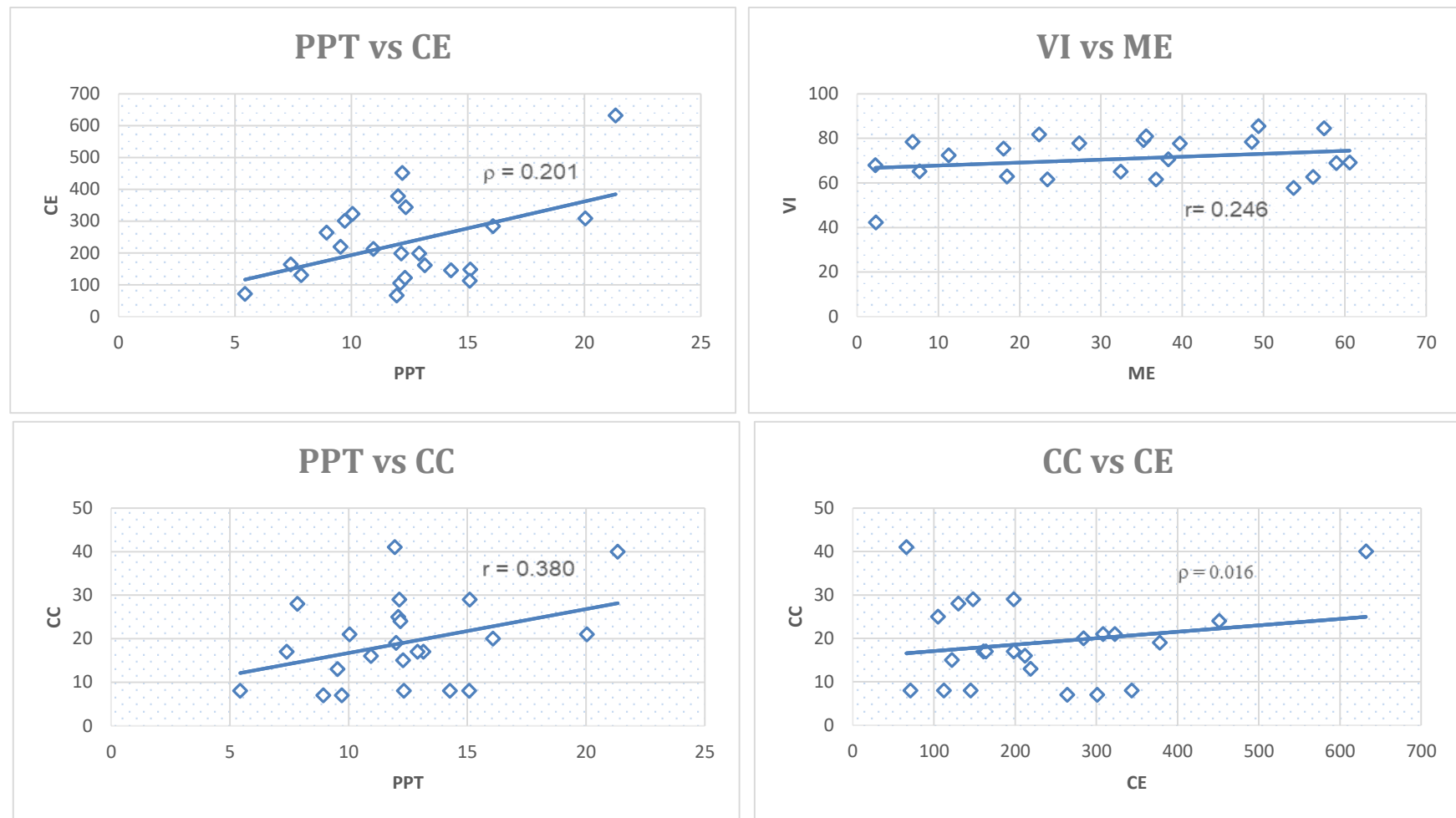


Figura 6: Gráficos de correlación entre los parámetros iniciales evaluados. No se encontraron relaciones significativas en ninguno de los casos ($p > 0.05$). PPT: Peso promedio testicular. CE: Concentración espermática. VI: Vitalidad inicial de células testiculares. CC: Concentración de células testiculares

Evaluación y caracterización de las SSC mediante citometría de flujo

Todas las muestras de células vivas fueron procesadas como se detalla en el punto (Evaluación mediante citometría de flujo). Se evaluaron 30 000 eventos mediante citometría de flujo, de estos se seleccionaron solo los eventos con forma redonda, ubicados en el cuadrante superior izquierdo del gráfico de ploteo (Figura 5). En dicha población de células redondas se encuentra una gama de células testiculares que van desde SSC, SSC en diferenciación temprana, espermatogonias de tipo B, espermatocitos y células somáticas, por lo que fue necesario clasificar las subpoblaciones en base a la presencia de fluorescencia verde como producto del marcaje de las células con el conjugado DBA-FITC (Tabla 7, Figura 6). Los valores de SSC se obtuvieron en porcentajes, y solo la población de células redondas fue evaluada con los marcadores de calidad y fueron caracterizadas como se detalla en la Tabla 8 (Figura 6).

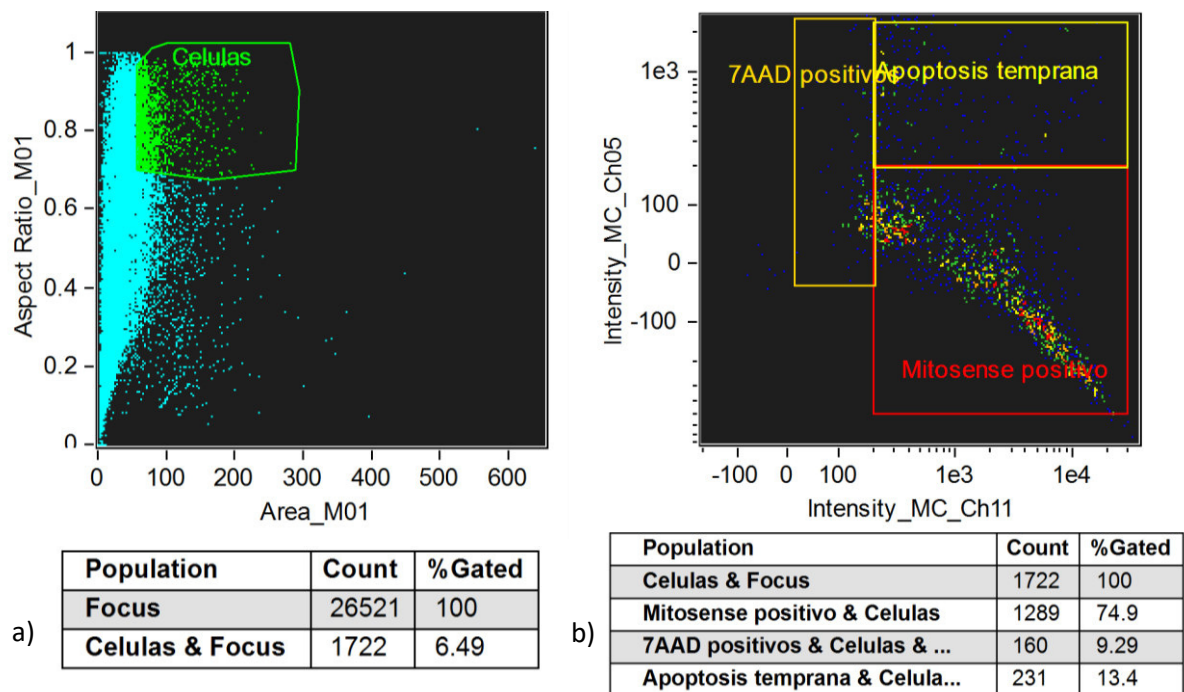


Figura 7: Ploteo y ubicación de las células redondas (recuadro verde), donde se ubican las SSC (a), así como la ubicación en el plot de citometría de las células con Potencial mitocondrial activo (recuadro rojo), en apoptosis temprana (recuadro amarillo) y apoptosis (recuadro naranja) (b).

Tabla 7: Subpoblaciones establecidas en la población de células redondas mediante el marcaje con DBA.FITC

Población identificada	Patrón de fluorescencia
SSC	Fluorescencia verde intensa (toda la célula), DBA positivas
SSC en diferenciación temprana	Fluorescencia verde débil.
Células diferenciadas	Sin fluorescencia verde, DBA negativas.

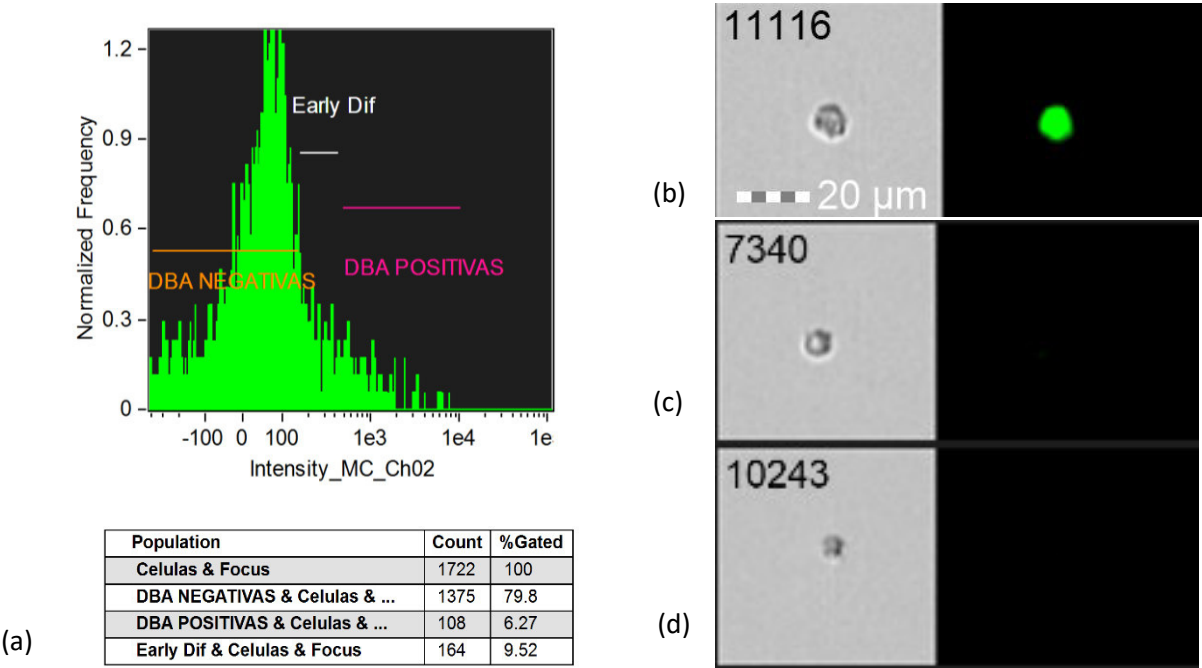


Figura 8: Poblaciones celulares establecidas de acuerdo a la Tabla 7. Se observan las SSC marcadas intensamente con DBA (b), células en diferenciación temprana marcadas débilmente con DBA (c) y las células diferenciadas no marcadas con DBA (d).

Tabla 8: Evaluación de la calidad de las SSC mediante el marcaje con el Kit MItopotential Red.

Sonda empleada	Características evaluadas	Patrón de fluorescencia
MITOSENSE	Potencial mitocondrial activo (PMA)	Fluorescencia roja intensa (toda la célula)
	Potencial mitocondrial inactivo	Sin fluorescencia roja
7-AAD	Apoptosis temprana (EA)	Fluorescencia naranja débil (solo puntos)
	Apoptosis (A)	Fluorescencia naranja intensa (toda la célula)
	No apoptóticas	Sin fluorescencia naranja

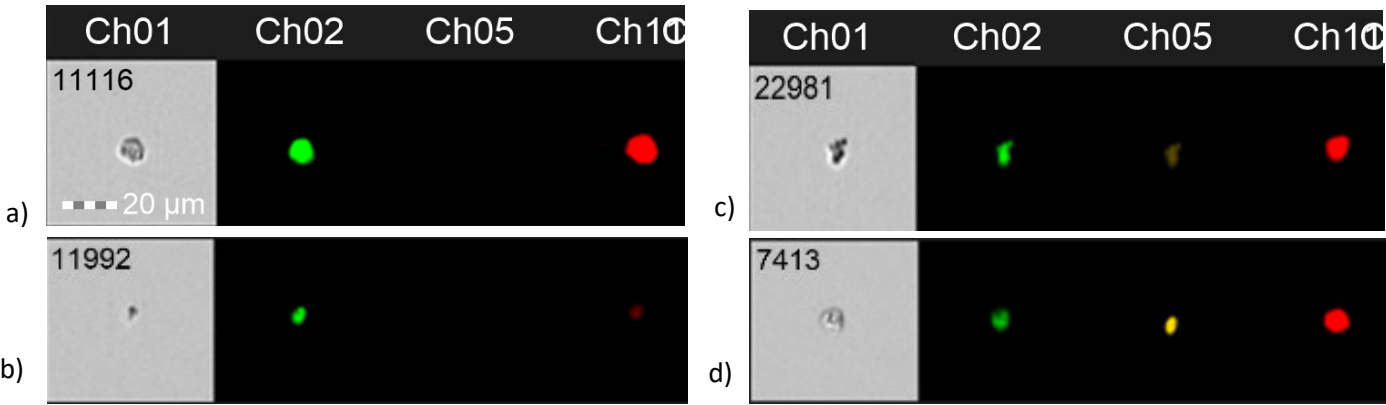


Figura 9: Calidad de las SSC de acuerdo a la Tabla 8. Se observan las células con potencial mitocondrial activo (a), aquellas con menor potencial mitocondrial (b), las células en apoptosis temprana (c) y células en apoptosis (d)

Cultivo celular

Cultivo de las SCI (FP)

Las SCI de cada animal fueron cultivadas en los medios de cultivo de acuerdo al Anexo 1. De las 23 muestras totales, 17 fueron cultivadas en medio STEMPRO con suero de leche materna y 6 fueron cultivadas en medio DMEM con el coctel de Factores de crecimiento. Todas las SCI se cultivaron con éxito y se evaluó el porcentaje de SSC mediante citometría de flujo. De las 23 muestras, las 3 primeras fueron fijadas después de 15 días de cultivo y el porcentaje de SSC (% SSC) se evaluó al día siguiente de la fijación, por lo que no se tienen valores de calidad celular. Las 20 muestras restantes fueron evaluadas vivas.

Se determinaron los estadísticos descriptivos (Media y DE) de las variables %SSC, %PMA, %A y %EA de las muestras clasificadas de acuerdo al medio de cultivo (Tabla 9) además se realizó la prueba de normalidad, y solo la variable %EA mostró una distribución normal, por lo que para las demás evaluaciones se emplearon pruebas no paramétricas. Se realizó la prueba de hipótesis correspondiente para evaluar si el medio empleado tiene algún efecto sobre dichos parámetros. No se observaron diferencias significativas en el %SSC ni en la calidad de las FP cultivados en ambos medios ($p > 0.05$), sin embargo, se observó una tendencia al incremento del porcentaje de SSC en el medio STEMPRO. A pesar de ello, es posible proponer que ambos medios permiten el mantenimiento, proliferación y calidad de las SSC en cultivo.

Tabla 9: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras Frescas Proliferadas (FP).
 SSC: Célula madre espermatogonial; PMA: Potencial mitocondrial activo, EA: Apoptosis temprana, A: Apoptosis.

Parámetro		Media	DE	Prueba de hipótesis
% SSC	STEMPRO	8.62 ± 1.62	6.06	p>0.05
	DMEM	4.56 ± 1.42	3.48	
% PMA	STEMPRO	78.02 ± 2.92	10.92	p>0.05
	DMEM	80.15 ± 2.07	5.07	
% EA	STEMPRO	8.36 ± 0.89	3.36	p>0.05
	DMEM	8.65 ± 1.01	2.49	
% A	STEMPRO	9.16 ± 1.44	5.39	p>0.05
	DMEM	11.06 ± 2.08	5.09	

Adicionalmente se evaluó el porcentaje de las SSC en diferenciación temprana. En las muestras cultivadas en el medio STEMPRO se obtuvo un % ED de 25.45 ± 3.26 , y en DMEM se obtuvo un valor de 13.85 ± 1.58 , y al realizar la prueba de hipótesis (se asumieron varianzas iguales) no hubo una diferencia significativa entre ambos valores. Finalmente, alícuotas de las SCI de 6 animales se fijaron antes del cultivo y se evaluó el porcentaje de SSC, se obtuvo un valor promedio de 5.89 ± 1 , y no se encontraron diferencias significativas con sus muestras cultivadas correspondientes (cultivo en DMEM) ($p > 0.05$).

Cultivo de las muestras criopreservadas (CP)

La SCI criopreservadas fueron descongeladas y cultivadas luego de 1 a 4 semanas después de su congelamiento (Anexo 2). De estas, 12 muestras fueron cultivadas en STEMPRO y 11 en DMEM, de modo que se volvió a evaluar si el medio de cultivo tenía algún efecto en el mantenimiento, proliferación y calidad de las células cultivadas postdescongelamiento. Las muestras fueron cultivadas entre 2 a 4 semanas, lo cual dependió de la apariencia de las células y el incremento aparente de la densidad celular.

De las 12 muestras cultivadas en STEMPRO, una fue perdida por contaminación, por lo que se evaluaron 11 muestras para el medio STEMPRO y 11 muestras para DMEM (Anexo 2). De forma similar a las FP, no se observó una diferencia significativa entre el %SSC ni en la calidad entre ambos medios (Tabla 10), por lo que ambos medios podrían permitir el mantenimiento del porcentaje y calidad de las SSC, mas no en la misma medida que en las muestras FP (detallado más adelante). Se observó una diferencia numérica entre el %SSC, con un valor mayor en las células cultivadas en STEMPRO, por lo que podría suponerse que para las muestras criopreservadas, el medio STEMPRO permitiría un mejor mantenimiento de las SSC, lo cual se ve respaldado por la variable %A, que es menor en dicho medio.

Parámetro		Media	DE	Prueba de hipótesis
% SSC	STEMPRO	2.03 ± 0.61	2.02	p>0.05
	DMEM	0.9 ± 0.22	0.75	
% PMA	STEMPRO	59.69 ± 7.54	24.99	p>0.05
	DMEM	59.63 ± 7.11	23.58	
% EA	STEMPRO	13.05 ± 2.05	6.82	p>0.05
	DMEM	9.85 ± 1.44	4.80	
% A	STEMPRO	13.87 ± 3.68	12.18	p>0.05
	DMEM	28.79 ± 8.53	28.28	

Tabla 10: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras Criopreservadas Proliferadas (CP). SSC: Célula madre espermato gonial; PMA: Potencial mitocondrial activo, EA: Apoptosis temprana, A: Apoptosis.

Adicionalmente se evaluó el porcentaje de las SSC en diferenciación temprana y se obtuvieron valores de 11.07 ± 4.24 y 6.54 ± 1.62 para STEMPRO y DMEM respectivamente, y no se observó una diferencia significativa entre ambos medios ($p>0.05$)

Comparación de SSC y calidad celular de las muestras FP, CP y PC

Las muestras FP fueron criopreservadas y luego descongeladas para evaluar el porcentaje y la calidad de las SSC postdescongelamiento con una proliferación previa. Se descongelaron 22 muestras, debido a que una muestra se perdió por contaminación en el proceso de cultivo (Anexo 2). Las muestras fueron descongeladas entre 2 a 5 semanas después de su criopreservación y se evaluó el %SSC, %PMA, %EA y %A teniendo en cuenta el medio de cultivo y no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los parámetros evaluados ($p < 0.05$) (Tabla 11), lo que indicaría que el cultivo previo a una criopreservación en cualquiera de los dos medios permite el mantenimiento, proliferación y calidad de las SSC postdescongelamiento.

Tabla 11: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras Proliferadas Criopreservadas (PC). SSC: Célula madre espermatoγονal; PMA: Potencial mitocondrial activo, EA: Apoptosis temprana, A: Apoptosis.

Parámetro		Media	DE	Prueba de hipótesis
% SSC	STEMPRO	6.61 ± 1.38	5.52	p>0.05
	DMEM	5.47 ± 2.39	5.86	
% PMA	STEMPRO	70.76 ± 5.71	22.85	p>0.05
	DMEM	77.48 ± 3.36	8.24	
% EA	STEMPRO	11.97 ± 1.87	6.75	p>0.05
	DMEM	10.68 ± 1.64	4.94	
% A	STEMPRO	5.89 ± 1.50	6.02	p>0.05
	DMEM	12.53 ± 3.77	9.23	

Finalmente, se procedió a comparar las variables ya mencionadas de las FP, CP y PC para evaluar el efecto de la proliferación antes y después de la criopreservación sobre el porcentaje y calidad de las SSC. Debido a que no se observaron diferencias significativas en el efecto de los medios empleados en los tres tipos de muestras, se emplearon los 23

animales para esta evaluación, aunque se excluyeron las muestras perdidas por contaminación en cada caso (Anexo 2).

Al evaluar el parámetro porcentaje de SSC se observó que las muestras CP mostraron un valor hasta 4 veces más bajo que el de las muestras FP y PC, y al realizar la prueba de hipótesis se hallaron diferencias significativas entre las CP y FP, y entre las CP y PC, mientras que las FP y PC no mostraron diferencia significativa. (Tabla 12). Los parámetros de calidad celular siguieron la misma tendencia del porcentaje de SSC, por lo que se puede sugerir que una proliferación previa a la criopreservación permitiría el mantenimiento del porcentaje y la calidad de las SSC postdescongelamiento.

Tabla 12: Porcentaje y calidad de las SSC de las muestras FP, CP y PC. Las letras pequeñas indican si existen diferencias significativas entre los valores. Letras iguales: No hay diferencia ($p>0.05$). Letras diferentes: Hay diferencia significativa ($p<0.05$). SSC: Célula madre espermatogonial; PMA: Potencial mitocondrial activo, EA: Apoptosis temprana, A: Apoptosis.

TIPO DE MUESTRA	%SSC	%PMA	%A	%EA
FRESCAS PROLIFERADAS	7.4 ± 1.3^a	78.7 ± 2.1^a	9.7 ± 1.2^a	8.5 ± 0.7^a
CRIOPRESERVADAS PROLIFERADAS	1.5 ± 0.3^b	59.7 ± 5.1^b	21.3 ± 4.3^b	11.5 ± 1.3^b
PROLIFERADAS CRIOPRESERVADAS	6.3 ± 1.2^a	72.6 ± 4.3^a	7.8 ± 1.6^a	8.1 ± 0.7^a

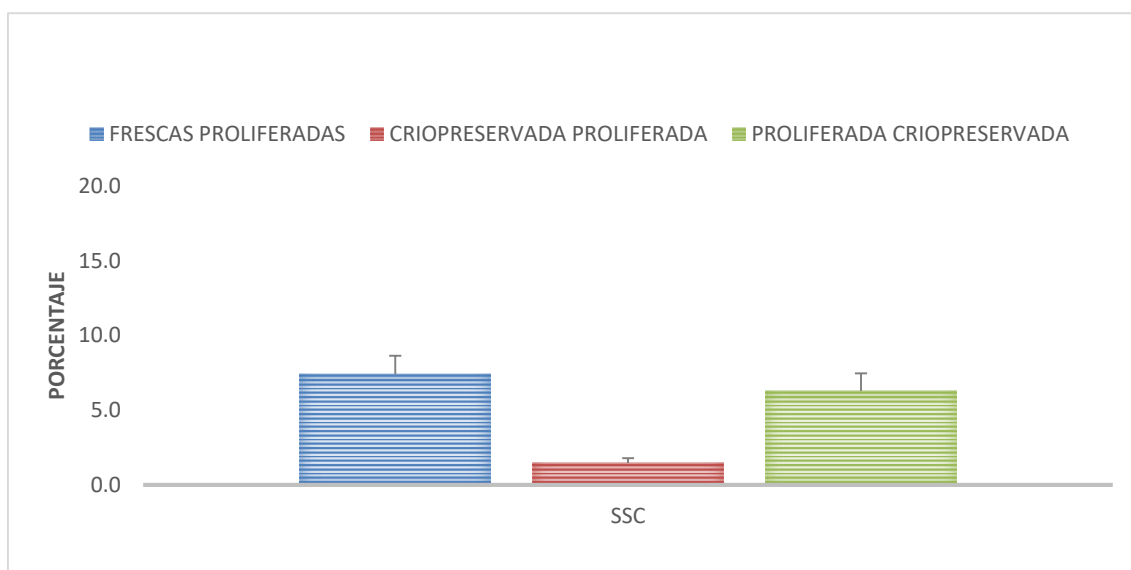


Figura 10: Comparación del porcentaje de SSC en cada tipo de muestra. Se observa que las muestras CP presentan una considerable disminución (de hasta 4 veces) en el porcentaje de SSC a comparación de las FP y PC ($p < 0.05$)

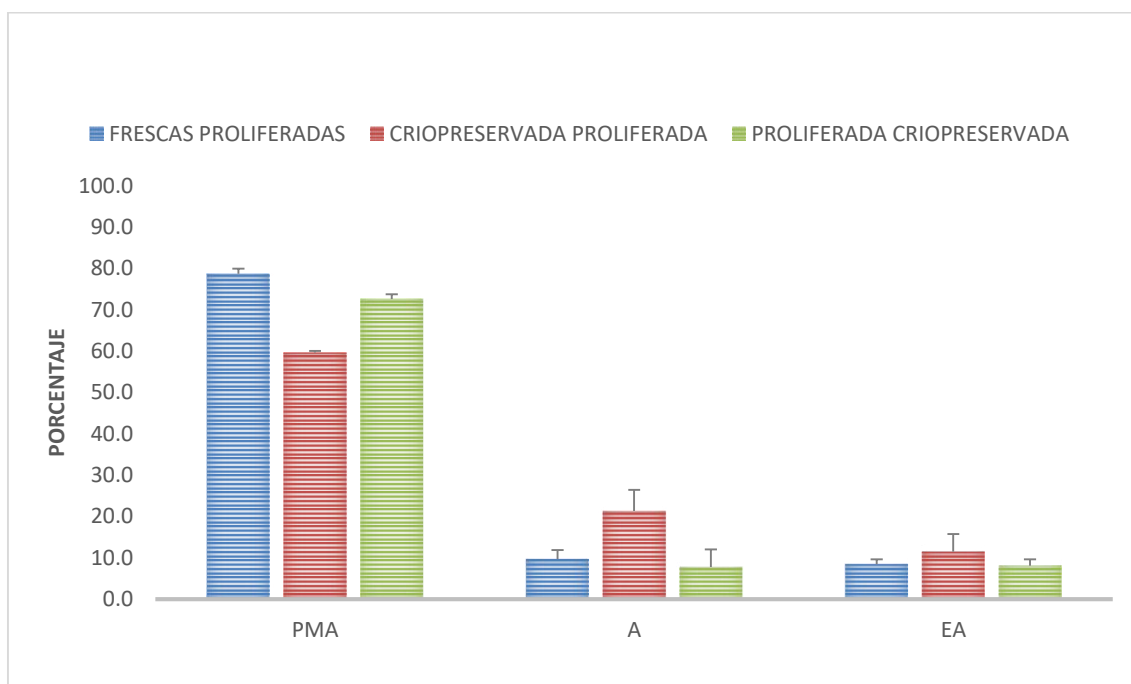


Figura 11: Comparación de la calidad de las SSC en cada tipo de muestra. Se observa que las muestras CP presentan una considerable disminución en el porcentaje de células con potencial mitocondrial activo, mientras que el porcentaje de células apoptóticas es mayor ($p < 0.05$). en el porcentaje de SSC. SSC: Célula madre espermatogonial; PMA: Potencial mitocondrial activo, EA: Apoptosis temprana, A: Apoptosis.

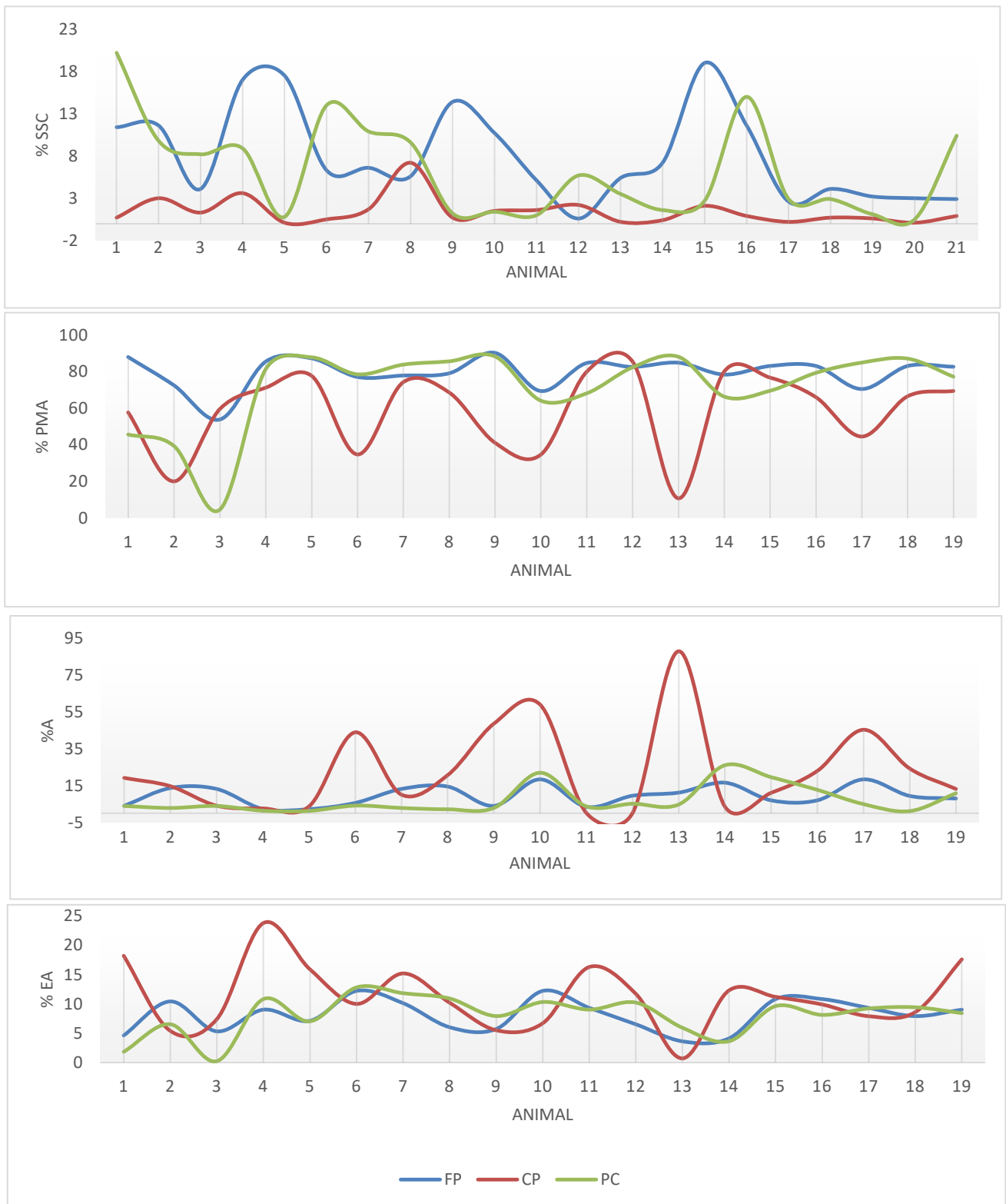


Figura 12: Variación del porcentaje y calidad de las SSC en los tres tipos de muestras evaluadas. Se consideraron solo las muestras completas para cada parámetro. Se observa que las muestras CP (Criopreservada y proliferada) presentan una mayor variación, mientras que las FP (Frescas proliferadas) y PC (Proliferada y Criopreservada) se mantienen más estables y con valores similares entre ambas. SSC: Célula madre espermatogonial; PMA: Potencial mitocondrial activo, EA: Apoptosis temprana, A: Apoptosis.

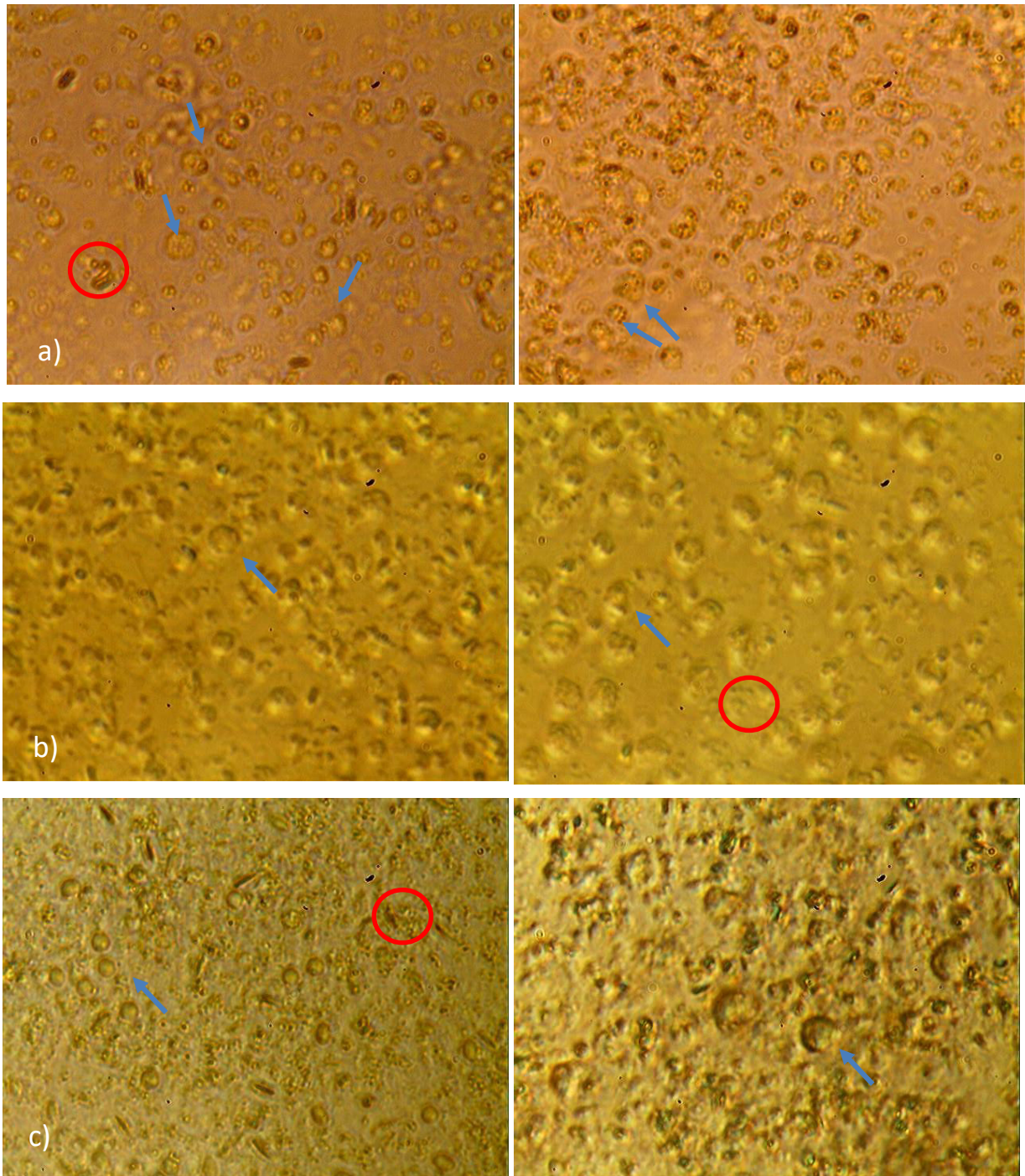


Figura 13: Células testiculares en cultivo de las muestras FP (a), muestras proliferadas y criopreservadas observadas luego del descongelamiento (b) y muestras proliferadas luego de una criopreservación (c). Se observan células redondas que constituyen las células testiculares (flechas azules) y algunos restos celulares o detritus (círculos rojos).

DISCUSIÓN

El presente trabajo es uno de los primeros reportes sobre el cultivo y criopreservación de SSC de muestras testiculares de alpacas luego de aproximadamente 24 horas de la muerte de los animales.

La evaluación de los parámetros celulares iniciales (concentración y vitalidad celular) permitieron establecer las características iniciales de las muestras empleadas de una forma más directa que con la evaluación de parámetros testiculares, ya que no se encontró una relación significativa entre dichos parámetros. Se trabajaron con tres biopsias testiculares de aproximadamente 0.8g por cada animal, por lo que el número de células testiculares obtenidos fue obtenido de aproximadamente 2.4g de tejido. Considerando ello, el promedio de células testiculares por gramo (CTP) fue de 15.9 ± 1.6 millones. g^{-1} con una vitalidad promedio de 70.7%.

En la literatura no hay reportes del número de células testiculares en alpaca ni de la proporción de las células germinales y somáticas en suspensiones celulares, pero sí hay registros en otras especies. Por ejemplo, en humanos, suspensiones celulares de hombre azoospermicos presentan entre 25 a 33 millones de células por gramo luego de digestiones enzimáticas de biopsias con tripsina, y vitalidades de 97 al 99% (Aslam et. al., 1998), en ratas se han observado densidades de 30 millones de células testiculares luego de digestiones con colagenasa, hialuronidasa, tripsina y DNAsa (Bucci et. al., 1986) y vitalidades superiores al 90% que puede reducir con el transcurso del tiempo de cultivo (Morena et. al., 1996) y en toro las suspensiones celulares tienen concentraciones de 40-80 millones por gramo (Herrid et. al., 2009). Los resultados del presente trabajo muestran una concentración celular menor a la observada en otros animales y los animales con mejor concentración se asemejan a aquellos observados en humanos azoospermicos.

Las suspensiones de células testiculares albergan diferentes poblaciones celulares que han sido caracterizadas en otras especies, como espermatogonias de tipo A y B, espermatoцитos primarios y células de Sertoli, que presentan los más altos porcentajes (> 60%). Por ejemplo, en toro, Izadyar et. al. (2002a) encontraron porcentajes de espermatogonias de tipo A de aproximadamente 25%, las cuales fueron clasificadas en dos subpoblaciones de acuerdo a su marcaje con DBA, cuya diferencia en la fluorescencia varía de acuerdo al estado de diferenciación. De forma similar, en rata también se han observado dos subtipos de espermatogonias de tipo A mediante inmunocitoquímica y RT-PCR (Morena et. al., 1996), que han llegado a representar hasta un 30% de las células testiculares. En este trabajo también se clasificaron a las células marcadas con DBA en dos poblaciones de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia (Tabla 7), con un valor promedio de las células marcadas en total fue de 24.2%, muy similar al encontrado en toro. Es probable que en alpaca la variación de la fluorescencia también se deba al estado de diferenciación, puesto que se han podido observar células marcadas con DBA y c-Kit, un marcador de diferenciación celular (Datos no mostrados).

Se evaluó la concentración inicial de las SSC en base a seis muestras fijadas, y se observó un porcentaje de 5.89 ± 1 de células marcadas con DBA (SSC) que se asemeja a las proporciones de espermatogonias indiferenciadas observadas en especies como rata (9%) (Bucci et. al., 1986) o cerdo (10%) (Luo et. al, 2006), así como en bovino, donde se ha propuesto un sistema de cultivo de gonocitos empleando placas recubiertas con DBA, estas células se han postulado como precursoras de SSC debido a su estado de diferenciación y presentan un porcentaje de 4.2 % de las células testiculares (Kim et. al, 2014). En trabajos anteriores realizados en el LFR se han encontrado valores de 6 a 8% de SSC en suspensiones de células testiculares marcadas con DBA (Valdivia, 2018),

siendo este trabajo una nueva evidencia para el establecimiento de la proporción de células madre en el testículo de alpaca

Es necesario resaltar que las proporciones de los tipos celulares observados en estas suspensiones varían de acuerdo a la edad de los animales donantes, por lo que en individuos adultos será más probable encontrar una menor proporción de espermatogonias indiferenciadas y de SSC. En cuanto a la vitalidad, si bien muchos protocolos de aislamiento donde se han empleado concentraciones similares de enzimas reportan porcentaje de vitalidad superiores al 80-90%, las muestras empleadas en dichos estudios son procesadas pocas horas después de la obtención de las biopsias, debido a la facilidad de su obtención, caso contrario al del presente estudio, donde las muestras son procesadas aproximadamente 24 horas post mortem en la mayoría de los casos.

El objetivo de este trabajo fue comparar la calidad de las células criopreservadas luego de dos procesos, en la primera se criopreservaron las células luego de las digestiones enzimáticas (CP), mientras que la otra se realizó luego del cultivo de células testiculares (PC). Al comparar ambos métodos, se observó un mayor porcentaje de SSC y una mejor calidad en las muestras que fueron previamente cultivadas ($p < 0.05$).

La criopreservación de las SSC se realizó en suspensiones celulares y en un medio estandarizado en el LFR. El medio suplementado con agentes crioprotectores permeables y con disacáridos ha mostrado eficiencia en la criopreservación de SSC de alpaca (Valdivia, 2018), y en otras especies también se ha demostrado un incremento en la supervivencia postdescongelamiento de este tipo celular en presencia de disacáridos, como sucrosa o trehalosa (Lee et. al., 2014a, Pan et. al, 2017).

En las suspensiones celulares se pierde el nicho de las SSC, lo cual puede alterar su supervivencia post descongelamiento, por lo que algunos autores recomiendan la

criopreservación de tejido testicular (Gouk et. al., 2011, Kim et. al., 2015). Sin embargo, debido al bajo porcentaje de las SSC en el tejido, se debe realizar un enriquecimiento previo de estas células, mediante técnicas como el plaqueo diferencial o cultivo. Por otro lado, algunos protocolos sugieren realizar la criopreservación de células cuando éstas presenten la mayor actividad y vitalidad, lo cual suele observarse en las fases proliferativas del cultivo celular (Baust et. al., 2016), y en el caso de las SSC, el cultivo previo de células testiculares realizado en las muestras PC, permitiría restaurar de forma parcial el nicho celular, debido a la presencia de las células somáticas en las suspensiones celulares que establecen interconexiones entre ellas formando una estructura similar a una red de células, sobre la cual se ubican las células germinales.

En los procesos de criopreservación, la membrana celular cumple el rol más importante ya que controla la salida del agua, evita la formación de hielo intracelular, media la entrada de crioprotectores y los cambios de volumen, por lo que su alteración causa daños irreparables en la célula durante la criopreservación. Teniendo en cuenta ello, el aislamiento de las SSC requiere disrupción mecánica y enzimática del tejido, lo cual puede influir en la vitalidad y permeabilidad de la membrana generando alteraciones que, si bien no inducen la muerte celular (observado en la prueba de vitalidad con Azul de Tripán), pueden incrementar la susceptibilidad de las células a otros daños (Romrell et. al., 1976), como los causados durante la criopreservación. Así, es probable que el daño de la membrana celular durante el aislamiento en las células CP haya causado una mayor sensibilidad de estas muestras al proceso de criopreservación, de forma que se hayan producido daños irreparables en las células, no solo en las somáticas, sino también en las SSC, a pesar de que estas suelen ser más resistentes a los procesos de criopreservación (Oatley et. al., 2004), lo que explicaría la reducción de las células marcadas con DBA en

este tipo de muestra y la reducción de la calidad celular, debido al mayor porcentaje de apoptosis observado.

En contraste, el cultivo previo otorga un tiempo de estabilización en presencia de carbohidratos, vitaminas y otros componentes presentes en el medio que pueden favorecer la reparación de daños en las células aisladas, por ello, a diferencia de las CP, las PC mostraron un mayor porcentaje de SSC y mejor calidad. Así, el cultivo de células permitió la estabilización y reparación de las células y una posible proliferación celular.

Como evaluación adicional, el cultivo de las células testiculares se realizó en dos tipos de medio, que son ampliamente empleados en el cultivo de SSC de especies como bovino y cerdo (Tabla 3). El medio DMEM es generalmente usado en proporción 1:1 con el medio HAMF12 y es adecuado para el cultivo de diferentes tipos celulares, incluyendo células madre. El medio STEMPRO, por otro lado, es especialmente diseñado para el cultivo de células madre hematopoyéticas humanas y es suplementado con una solución de nutrientes que puede contener elementos similares a los proporcionados por el suero. Ambos medios son diseñados como medios libres de suero, por lo que no requieren la suplementación con dicho compuesto y permiten el mantenimiento celular. Para el cultivo de SSC, sin embargo, DMEM/F12 suele ser suplementado con suero al 10% de forma que este compuesto proporcione los factores de crecimiento necesarios para la proliferación de dichas células, mientras que el medio STEMPRO es generalmente empleado sin la adición de suero, aunque se suele suplementar con BSA y reemplazos de suero (Tabla 3).

Se ha comprobado que la presencia de suero es necesaria para la inducción de la proliferación de SSC en cultivos de células de ratón, aunque esta puede verse inhibida a altas concentraciones (10-15%) debido a la inducción de la proliferación de células

somáticas (Kanatsu-Shinohara et. al., 2005), por lo que en este trabajo se ha empleado el suero al 1%, de forma que se pueda mantener la presencia de dicho compuesto sin inducir mayor inhibición en la proliferación de las SSC, además se ha añadido BSA (5mg/ml) debido a las propiedades protectoras de este compuesto, y para suplir las funciones del suero, como la estabilización del medio y complementar la fuente proteica.

En medios libres de suero, es más común el empleo de los factores de crecimiento, de forma que se puedan establecer mejor los mecanismos de acción de dichas moléculas (Kubota et. al, 2004), ya que tanto el suero como el BSA contienen componentes no identificados que pueden influir en el metabolismo celular e inducir la proliferación, pero también la diferenciación celular, por lo que son factores que reduce la repetitividad de los estudios, ya que su composición varía de una forma no controlable en cada lote de producción. Debido a que uno de los objetivos de este trabajo fue la proliferación *in vitro* de las SSC, se añadieron diferentes factores de crecimiento al medio DMEM, en presencia de suero y BSA, mientras que el medio STEMPRO fue suplementado con suero de leche, de forma que se pueda proporcionar un medio adecuado para el mantenimiento y proliferación de dichas células.

Aponte et. al. (2008) describieron el empleo de dos medios de cultivo para la proliferación de SSC en bovino y en su estudio observaron una mayor eficiencia en la proliferación con el medio STEMPRO a comparación del medio MEM suplementado con SFB al 1%, sin embargo, en dicho estudio, solo el medio STEMPRO fue suplementado con los factores de crecimiento. En este trabajo, el medio STEMPRO con suero de leche humano y el medio DMEM con factores de crecimiento permitieron el mantenimiento de las células testiculares, así como el porcentaje y calidad de las SSC ($p > 0.05$), aunque el medio STEMPRO mostró mayores valores de %SSC. Esto abre la posibilidad del empleo del

medio STEMPRO con factores de crecimiento, el cual podría permitir una mayor proliferación de las SSC y un mejor estudio de la proliferación in vitro de las SSC de alpaca.

En cuanto al cultivo, no se observó una alta proliferación celular en las FP, ya que el porcentaje de SSC no presentó una diferencia significativa con las células iniciales fijadas ($p > 0.05$). Esto pudo deberse a la presencia de células somáticas testiculares que pudieron proliferar desmedidamente y reducir la presencia de nutrientes necesarios para la inducción de la proliferación de las SSC, como reportan otros autores (Kanatsu-Shinohara et. al 2004). Sin embargo, a pesar de que la presencia de células somáticas puede ser problemática, se ha reportado que el mantenimiento del nicho de las SSC puede mejorar su proliferación (Kim et. al., 2014, Lee et. al., 2013), esto debido a que las células somáticas, como las células de Sertoli y de Leydig, producen factores de crecimiento como el GDNF, o factores inductores de formación de colonias, pero, además su contacto con las SSC podría influir también en la proliferación, ya que en estudios con componentes de las matrices extracelulares y algunas lectinas, como el DBA, han descrito que la interacción de las SSC a través de proteínas glicosiladas con las células o proteínas de su nicho puede ser necesaria para la inducción de la proliferación (Kim et. al., 2014). Por ello, la presencia de células somáticas aún es necesaria en los cultivos de SSC, razón por la cual algunos estudios reportan el enriquecimiento, más no la completa purificación de estas células, de forma que se pueda mantener el nicho celular.

El cultivo de SSC de alpaca se realizó entre 15 a 22 días, pero se han descrito tiempos de duplicación celular de 5.6 días a una semana de cultivo en otras especies, y la disminución de estas células entre las dos y tres semanas de cultivo para luego volver a incrementar (Aponte et. al., 2008), por lo que el número de SSC en los cultivos pudo verse reducido

luego de la primera semana de cultivo y no haber tenido el tiempo suficiente para incrementar su porcentaje antes de ser evaluadas, por ello estudiar la dinámica de crecimiento de las SSC de alpaca es importante para poder proponer medios que soporten cultivos largos y el posterior establecimiento de líneas celulares.

Debido a que existen reportes de cultivo largos de SSC, principalmente en ratón, donde se han mantenido cultivos de hasta 6 meses, es comprobado que estas células proliferan *in vitro*, debido a su característica de células madre, sin embargo, en dichos estudios las SSC suelen ser enriquecidas mediante columnas de Percoll, MACS o FACS y plaqueo diferencial, por lo que dichas alternativas podrían ser rutas para el enriquecimiento y proliferación de las SSC en alpaca.

Finalmente, en este trabajo se caracterizaron los animales empleados mediante la evaluación de tres parámetros, el peso promedio testicular (PPT), la concentración (CE) y la movilidad (ME) de espermatozoides epididimarios que permitieron la valoración de la calidad inicial de las muestras espermáticas y una posible clasificación de acuerdo al potencial reproductivo. Se observó un peso promedio de 12.29 g, el cual es menor al peso promedio de individuos adultos de aproximadamente 15-18 g previamente reportado por Bravo et. al. (2000). Esto podría deberse a que el peso y tamaño testicular varían de acuerdo al peso corporal y edad (Mujica et. al, 2015), además, es importante resaltar que las muestras empleadas en este estudio son muestras obtenidas de animales beneficiados, que pudieron ser dirigidos a la producción de carne debido a que no presentaban las mejores características reproductivas o a su edad avanzada, lo cual disminuye las capacidades reproductivas. Esto podría explicar la alta variabilidad de los diferentes parámetros iniciales. Adicionalmente, en otros estudios poblacionales se ha reportado un porcentaje considerable de anomalías reproductivas en alpacas macho, como hipoplasia

o anaplasia testicular, que afectan a un 30% de la población (Hilares, 2016) o quistes testiculares difíciles de identificar, presentes en un 9 a 15%, lo cual también puede afectar la calidad inicial de las muestras empleadas en este trabajo.

En este trabajo se emplearon espermatozoides epididimarios para la evaluación del potencial reproductivo de los animales empleados, se observaron valores de concentración de 231 ± 28.04 millones de espermatozoides. ml^{-1} y $32.27\% \pm 3.96$ de espermatozoides móviles los cuales han mostrado similitud con valores promedios de otros estudios realizado a condiciones similares, es decir en espermatozoides epididimarios evaluados 12 horas (a más) post mortem en los cuales se han reportado valores de movilidad espermática de 47% y concentración de 57 millones. ml^{-1} respectivamente, con porcentajes de viabilidad de más del 70% (Canorio, 2008-2015), que difieren de los parámetros espermáticos de muestras eyaculadas.

Según algunos reportes, la concentración de espermatozoides eyaculados es baja, variando entre 82 000 a 100 millones.. ml^{-1} mientras que la movilidad puede variar desde valores bajos hasta un 91% de espermatozoides móviles (Bravo et. al, 2000, Santiani, 2012). En este tipo de muestras, el número de espermatozoides es menor, pero los parámetros de movilidad y vitalidad son mayores. Reportes donde se emplearon muestras enfriadas a 4°C a 5°C con crioprotectores mostraron 60% de espermatozoides móviles, que pueden ser guardados por hasta 36 horas y empleado para inseminación artificial con un porcentaje de movilidad de 35-40% (Bravo et. al, 2000, Santiani et. al, 2005), valores similares a los obtenidos en este trabajo.

Se evaluó la correlación de estos parámetros con el peso promedio testicular, sin embargo, no se logró establecer ninguna relación significativa entre dichos parámetros, a pesar de que algunos autores han propuesto una relación entre el tamaño testicular y la producción

espermática en alpaca, como indicador del inicio de la producción espermática, pero aún no se ha establecido una relación directa con la concentración espermática u otros parámetros funcionales como movilidad, vitalidad, anomalías, etc. en alpaca. Esto debido a que se ha sugerido que otras características pueden influir en dicha relación, como la edad, peso (Abraham et. al, 2015), el estado nutricional y crianza (Barth, 2007, Fitzgerald & Morgan, 2007). En alpaca, existe una alta variabilidad en los parámetros espermáticos evaluados en individuos adultos (Tibary & Vaughan, 2006), por lo que establecer una relación entre dichos parámetros requeriría la inclusión de información adicional como estado nutricional, condiciones de crianza (Abraham et. al. 2015), así como el historial genético, ya que existe una alta diversidad genética intraespecífica en la alpaca peruana que podría influir en el potencial reproductivo (La Manna et. al, 2011, Paredes et. al., 2013, Barreta et. al., 2012)

En base a todo lo mencionado, este trabajo permite sugerir que el cultivo previo a la criopreservación de las SSC de alpaca permite una mayor conservación del porcentaje y la calidad celular que la criopreservación luego del aislamiento celular. Esto contribuye al desarrollo de las biotecnologías reproductivas en dicha especie y, a la vez, es un antecedente para un mayor estudio de las células madre espermatogoniales cultivadas y criopreservadas, las cuales pueden ser empleadas para procesos de cultivos posteriores con la finalidad de establecer líneas celulares y/o germinales que permitan la preservación de material genético y su posterior aplicación en biotecnología reproductiva y conservación.

CONCLUSIONES

- El cultivo de células testiculares de alpaca previo a la criopreservación permite conservar un mayor porcentaje ($6,3\% \pm 1.2$) de SSC que la criopreservación sin cultivo previo ($1.5\% \pm 0.3$); asimismo conserva la calidad de las SSC a diferencia de las células criopreservadas sin cultivo.
- El cultivo de células testiculares permite el mantenimiento del porcentaje y la calidad de las SSC de alpaca en muestras testiculares de alpaca 24 horas post mortem.

RECOMENDACIONES

- Cultivar las células madre espermatogoniales presentes en las suspensiones testiculares de alpaca antes de su criopreservación.
- Establecer la dinámica de proliferación celular de las SSC para mejorar la aplicación de la técnica de cultivo.
- Enriquecer la fracción de células madre espermatogoniales mediante estrategias como plaqueo diferencial o separación con columnas de Percoll.
- Cultivar las células testiculares en medio STEMPRO o DMEM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.-

Abraham M. C. (2016). Reproductive Biotechnologies in Swedish Alpacas (Licentiate Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.

Abraham, M. C., Puhakka, J., Ruete, A., Al-Essawe, E. M., Verdier, K., Morrell, J. M., & Båge, R. (2015). Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1), 10. doi: 10.1186/s13028-016-0191-x

Aliakbari, F., Gilani, M. A. S., Amidi, F., Baazm, M., Korouji, M., Izadyar, F., Yazdekhest, H. & Abbasi, M. (2016a). Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, 18(2), 87-95. doi: 10.1089/cell.2015.0067

Aliakbari, F., Yazdekhesti, H., Abbasi, M., Hajian Monfared, M., & Baazm, M. (2016b). Advances in cryopreservation of spermatogonial stem cells and restoration of male fertility. *Microscopy research and technique*, 79(2), 122-129. doi:10.1002/jemt.22605

Anchordoguy, T. J., Rudolph, A. S., Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24(4), 324-331. doi:10.1016/0011-2240(87)90036-8

Andrae, U., Singh, J., & Ziegler-Skylakakis, K. (1985). Pyruvate and related α -ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicology letters*, 28(2-3), 93-98. doi:10.1016/0378-4274(85)90015-3

Aponte, P. M., Soda, T., Teerds, K. J., Mizrak, S. C., van de Kant, H. J. G., & de Rooij, D. G. (2008). Propagation of bovine spermatogonial stem cells *in vitro*. *Reproduction*, 136(5), 543–557. doi:10.1530/rep-07-0419.

Ashwood-Smith, M. J., & Friedmann, G. B. (1979). Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196° in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 16(2), 132-140. doi:10.1016/0011-2240(79)90023-3

Aslam, I., Robins, A., Dowell, K., & Fishel, S. (1998). Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(3), 639-645. doi:10.1093/humrep/13.3.639

Auger, J. (2018). Spermatogenic Cells-Structure. En M. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction, (Second Edition)* (53-60). Washington, USA: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64561-0>

Baert, Y., Braye, A., Struijk, R. B., Van Pelt, A. M., & Goossens, E. (2015). Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter *in vitro* cell dynamics. *Fertility and sterility*, 104(5), 1244-1252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1134>

Barreta, J., Iñiguez, V., Saavedra, V., Romero, F., Callisaya, A. M., Echalar, J., Gutiérrez-Gil, B., & Arranz, J. J. (2012). Genetic diversity and population structure of Bolivian alpacas. *Small Ruminant Research*, 105(1-3), 97-104. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.03.002

Barth, A. (2007). Evaluation of potential breeding soundness of the bull. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)* (pp. 228-240). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9323-1.X5001-6>

Baust, J. M., Corwin, W., Snyder, K. K., Van Buskirk, R., & Baust, J. G. (2016). Cryopreservation: evolution of molecular based strategies. En F. Karimi-Busheri & M.

Weinfeld (Ed.) *Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells* (pp. 13-29). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-45457-3

Bengtsson, F. (2016). Fibre quality and fertility in male alpacas in Cusco region, Peru.

Blombach, B., & Takors, R. (2015). CO₂–intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 108. doi: 10.3389/fbioe.2015.00108

Bols, N. C., Mosser, D. D., & Steels, G. B. (1992). Temperature studies and recent advances with fish cells *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 103(1), 1-14. doi:10.1016/0300-9629(92)90235-i

Bonacic, C. (1991). Características biológicas y productivas de los camélidos sudamericanos. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 6(2). doi: 10.5354/0719-5273.2010.4642

Bravo, P. W., Skidmore, J. A., & Zhao, X. X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 173-193. doi:10.1016/s0378-4320(00)00158-5

Bucci, L. R., Brock, W. A., Johnson, T. S., & Meistrich, M. L. (1986). Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early primary spermatocytes from rat testes. *Biology of reproduction*, 34(1), 195-206. doi:10.1095/biolreprod34.1.195

Canorio N. (2008). Criocapitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*) (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Canorio, N. (2015). Efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) (Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Casas, H., San Martin, F. M., & Copaira, A. M. (1966). Aspectos histológicos del testículo de la alpaca, *Lama pacos*. *Rev. Fac. Med. Vet.(Lima)*, 18, 223-238. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000300067>

Condori, N. (2014). Estimación de parámetros genéticos para caracteres reproductivos en alpacas Huacaya (*Vicugna pacos*) del CIP Quimsachata del INIA-Puno (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohamn. Tacna, Perú.

Condori, A. (2014). Estructura poblacional y variabilidad fenotípica de alpacas (*Vicugna pacos*) en la comunidad de Tocra, distrito de Yanque, provincia de Caylloma, región Arequipa–2012 (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María, Arequipa.

Croce, C. M., Koprowski, H., & Eagle, H. (1972). Effect of environmental pH on the efficiency of cellular hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(7), 1953-1956. doi:10.1073/pnas.69.7.1953

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., & Wistrom, C. A. (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, 242(1), 1. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1147656/pdf/biochemj00261-0011.pdf>

De Rooij, D. G. (2015). The spermatogonial stem cell niche in mammals. En M. Griswold (Ed.) *Sertoli Cell Biology* (Second Edition) (pp. 99-121). doi: 10.1016/B978-0-12-417047-6.00001-6

- De Rooij, D. G. (2017a). Organization of the Seminiferous Epithelium and the Cycle, and Morphometric Description of Spermatogonial Subtypes (Rodents and Primates). En J. Oatley & M. Griswold (Ed.) *The Biology of Mammalian Spermatogonia* (pp. 3-20). New York, USA: Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-7505-1
- De Rooij, D. G. (2017b). The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, 144(17), 3022–3030. doi:10.1242/dev.146571
- De Rooij, D. G., & Grootegoed, J. A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(6), 694–701. doi:10.1016/s0955-0674(98)80109-9
- Delhon, G. A., & von Lawzewitsch, I. (1987). Reproduction in the male llama (*Lama glama*), a south American camelid. *Cells Tissues Organs*, 129(1), 59-66. doi:10.1159/000146378
- Díaz, H. (2014). Evaluación de las características bioquímicas del plasma seminal de alpacas, fresco y post descongelamiento (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Eagle, H. (1971). Buffer combinations for mammalian cell culture. *Science*, 174(4008), 500-503. doi:10.1126/science.174.4008.500
- Eagle, H. (1973). The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *Journal of cellular physiology*, 82(1), 1-8. doi:10.1002/jcp.1040820102
- Elzawam, A. Z. (2013). Establishment of spermatogenesis following testicular tissue ectopic xenografting in alpaca (PhD Thesis). Washington State University. USA.

Evangelista, O. (2015). Caracterización morfométrica de los espermatozoides en alpacas macho (*Vicugna pacos*) de fertilidad comprobada (Tesis de pregrado) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Ferreira, C. M., Pinto, I. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. (2015). (Un) suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—a review. *RSC Advances*, 5(39), 30989-31003. doi: 10.1039/c4ra15453c

Fitzgerald, J., & Morgan, G. (2007). Reproductive physiology of the ram. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)* (pp. 617-620). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9323-1.X5001-6>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2012). ‘Cryoconservation of Animal Genetic Resources.’ FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. (FAO: Rome.)

Franklin, W. L. (1982). Biology, ecology, and relationship to man of the South American camelids. *Mammalian Biology in South America*, 6, 457-489.)

Fryer, J. L., & Lannan, C. N. (1994). Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods*, 16(2), 87-94. doi:10.1007/bf01404816

Galloway, D. B. (2000). The development of the testicles in alpacas in Australia. In *Proceedings of the Australian Alpaca Association Conference, Canberra* (pp. 21-23).

Garnica, J., Achata, R., & Bravo, P. W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*, 32(1-2), 85-90. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90059-Z)

Gelman, J., Cardozo, A., & Mueller-Haye, B. (1981). *Especies zootécnicas nativas de los andes altos* (No. FAO APHP-22). FAO, Roma (Italia).

Goel, S., Reddy, N., Mandal, S., Fujihara, M., Kim, S. M., & Imai, H. (2010). Spermatogonia-specific proteins expressed in prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia. *Theriogenology*, 74(7), 1221-1232. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.05.025

Goel, S., Sugimoto, M., Minami, N., Yamada, M., Kume, S., & Imai, H. (2007). Identification, isolation, and *in vitro* culture of porcine gonocytes. *Biology of Reproduction*, 77(1), 127-137. doi: 10.1095/biolreprod.106.056879

González, R., Tang, L., & Dobrinski, I. (2017). Application of Spermatogonial Transplantation in Agricultural Animals. En J. Oatley & M. Griswold (Ed.) *The Biology of Mammalian Spermatogonia* (pp. 343-377). New York, USA: Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-7505-1

Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., & Singh, R. M. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *biochemistry*, 5(2), 467-477. doi:10.1021/bi00866a011

Gouk, S. S., Loh, Y. F. J., Kumar, S. D., Watson, P. F., & Kuleshova, L. L. (2011). Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertility and sterility*, 95(7), 2399-2403. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.035.

Guo, Y., Hai, Y., Gong, Y., Li, Z., & He, Z. (2013). Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells. *Journal of cellular physiology*, 229(4), 407-413. doi: 10.1002/jcp.24471

Hagrot, E. (2011). Development of a culture system for modeling of pH effects in CHO cells (Tesis de maestría). KTH School of Biotechnology. Sweden

Hamidabadi, H. G., & Bojnordi, M. N. (2017). Co-culture of mouse spermatogonial stem cells with sertoli cell as a feeder layer, stimulates the proliferation and spermatogonial stemness profile. *Middle East Fertility Society Journal*, 23(2), 107-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mefs.2017.09.004>

He, Z., Kokkinaki, M., Jiang, J., Dobrinski, I., & Dym, M. (2010). Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biology of reproduction*, 82(2), 363-372. doi: 10.1095/biolreprod.109.07855

Hermann, B. P., Sukhwani, M., Hansel, M. C., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents?. *Reproduction*, 139(3), 479-493. doi: 10.1530/REP-09-0255

Herrid, M., Davey, R. J., Hutton, K., Colditz, I. G., & Hill, J. R. (2009). A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(3), 393-399. doi: 10.1007/s00441-007-0445-z

Herrid, M., Vajta, G., & Skidmore, J. A. (2017). Current status and future direction of cryopreservation of camelid embryos. *Theriogenology*, 89, 20-25.

Hilares, M. (2016). Patologías Reproductivas En Alpacas (*Vicugna pacos*) Beneficiadas En La Comunidad De Iscahuaca-Distrito De Cotarusse-Aymaraes (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurimac. Apurimac, Perú.

Hosios, A. M., Hecht, V. C., Danai, L. V., Johnson, M. O., Rathmell, J. C., Steinhäuser, M. L., Manalis, S. R. & Vander Heiden, M. G. (2016). Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells. *Developmental cell*, 36(5), 540-549. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.012>

Huanca, N. (2016). Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando el Integrated Semen Analysis System-ISAS (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. K'ayra, Cusco..

Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2012). FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development*, dev-076539. doi:10.1242/dev.076539

Itagaki, A., & Kimura, G. (1974). TES and HEPES buffers in mammalian cell cultures and viral studies: problem of carbon dioxide requirement. *Experimental cell research*, 83(2), 351-361. doi:10.1016/0014-4827(74)90349-8

Izadyar, F., Matthijs-Rijsenbilt, J. J., Den Ouden, K., Creemers, L. B., Woelders, H., & de Rooij, D. G. (2002b). Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *Journal of andrology*, 23(4), 537-545.

Izadyar, F., Spierenberg, G. T., Creemers, L. B., Den Ouden, K., & De Rooij, D. G. (2002a). Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction*, 124(1), 85-94. doi:10.1530/rep.0.1240085

Johnson, W. E. (2014). Camelid Genetics and Reproductive Biotechnologies. *Journal of Heredity*, 105(6), 931-932. doi: 10.1093/jhered/esu069.

Kanatsu-Shinohara, M., Ikawa, M., Takehashi, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Kazuki, Y., Lee, J., Toyokuni, S., Oshimura, M., Ogura, A. & Ogura, A. (2006). Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8018-8023. doi:10.1073/pnas.0601139103

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Yoshida, S., Toyokuni, S., Lee, J., Ogura, A & Shinohara, T. (2007). Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. *Biology of reproduction*, 76(1), 55-62. doi:10.1095/biolreprod.106.055863

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Takashima, S., Takehashi, M., Ogonuki, N., Morimoto, H., Nagasawa, T., Ogura, A. y Shinohara, T. (2012a). Reconstitution of Mouse Spermatogonial Stem Cell Niches in Culture. *Cell Stem Cell*, 11(4), 567–578. doi:10.1016/j.stem.2012.06.011

Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., & Shinohara, T. (2005). Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biology of reproduction*, 72(4), 985-991. doi: 10.1095/biolreprod.104.036400

Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., & Shinohara, T. (2012b). Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression. *Biology of reproduction*, 87(6), 139-1. doi: 10.1095/biolreprod.112.103861

Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., & Shinohara, T. (2016). Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by the stem cell dye CDy1. *Biology of reproduction*, 94(1), 13, 1-10. doi: 10.1095/biolreprod.115.135707

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2003). Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Human reproduction*, 18(12), 2660-2667. doi:10.1093/humrep/deg483

Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Ishii, K., & Shinohara, T. (2011). Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One*, 6(8), e23663. doi:10.1371/journal.pone.0023663

Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2004). Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells in vivo. *Biology of reproduction*, 71(4), 1202-1207. doi:10.1095/biolreprod.104.031294

Kim, K. J., Lee, Y. A., Kim, B. J., Kim, Y. H., Kim, B. G., Kang, H. G., Jung, S. E., Choi, S. H., Schmidt, J. A. & Ryu, B. Y. (2015). Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. *Cryobiology*, 70(2), 175-183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.007>

Kim, S. M., Fujihara, M., Sahare, M., Minami, N., Yamada, M., & Imai, H. (2014). Effects of extracellular matrices and lectin Dolichos biflorus agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(2), 268-281. <http://dx.doi.org/10.1071/RD12214>

Kubota, H., & Brinster, R. L. (2018). Spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction*, 99(1), 52–74. doi:10.1093/biolre/iroy077

Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2004). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biology of reproduction*, 71(3), 722-731. doi:10.1095/biolreprod.104.029207

La Manna, V., La Terza, A., Ghezzi, S., Saravanaperumal, S., Apaza, N., Huanca, T., Bozzi, R., Renieri, C. (2011). Analysis of genetic distance between Peruvian Alpaca (Vicugna Pacos) showing two distinct fleece phenotypes, Suri and Huacaya, by means of microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science*, 10(4), e60. doi:10.4081/ijas.2011.e60

Lee, W. Y., Park, H. J., Lee, R., Lee, K. H., Kim, Y. H., Ryu, B. Y., Kim, N. M., Kim, J. H., Kim, J. H., Moon, S. H., Chung, H. J., Kim, D. H. & Park, J. K. (2013). Establishment and *in vitro* culture of porcine spermatogonial germ cells in low temperature culture conditions. *Stem cell research*, 11(3), 1234-1249. doi: 10.1016/j.scr.2013.08.008

Lee, Y. A., Kim, Y. H., Ha, S. J., Kim, B. J., Kim, K. J., Jung, M. S., Jung, M. S., Kim, B. G. & Ryu, B. Y. (2014a). Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. *Fertility and sterility*, 101(4), 1165-1175. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.033.

Lee, Y. A., Kim, Y. H., Ha, S. J., Kim, K. J., Kim, B. J., Kim, B. G., Choi, S. H., Kim, I. C. Schmidt, J. A. & Ryu, B. Y. (2014b). Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose. *J Anim Sci*, 92(92), 984-995. doi:10.2527/jas.2013-6843

Lee, Y. A., Kim, Y. H., Kim, B. J., Jung, M. S., Auh, J. H., Seo, J. T., Park, Y. S., Lee, S. H. & Ryu, B. Y. (2013). Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol. *Biology of reproduction*, 89(5), 109-1. doi: 10.1095/biolreprod.113.111195

Liu, S., Tang, Z., Xiong, T., & Tang, W. (2011). Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 141. doi:10.1186/1477-7827-9-141.

López Apaza, S. A. (2017). Evaluación de los parámetros reproductivos en alpacas (*Vicugna pacos*) de la raza huacaya en las comunidades altoandinas de Huaytire y Maure, Tacna-2015 (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman. Tacna, Perú.

Lord, T., & Oatley, J. M. (2017). Regulation of Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Self-Renewal. En J. Oatley & M. Griswold (Ed.) *The Biology of Mammalian Spermatogonia* (pp. 91-129). New York, USA: Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-7505-1

Luo, J., Megee, S., Rathi, R., & Dobrinski, I. (2006). Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Molecular reproduction and development*, 73(12), 1531-1540. doi:10.1002/mrd.20529

Lupton, C., McColl, A., & Stobart, R. (2006). Fiber characteristics of the Huacaya Alpaca. *Small Ruminant Research*, 64(3), 211-224. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.04.023

Mackenzie, C. G., Mackenzie, J. B., & Beck, P. (1961). The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 9(1), 141-156. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2224984/>

- Marin, J. C., Zapata, B., Gonzalez, B. A., Bonacic, C., Wheeler, J. C., Casey, C., ... & Spotorno, Á. E. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista chilena de historia natural*, 80(2), 121-140. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2007000200001>
- Martinez, E. & Ramos, M. (2015). Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica, Perú.
- Mazur, P., Leibo, S. P., & Chu, E. H. Y. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental cell research*, 71(2), 345-355. doi:10.1016/0014-4827(72)90303-
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2017). Plan nacional de desarrollo ganadero, período 2017 – 2027.
- Mirzapour, T., Movahedin, M., Tengku Ibrahim, T. A., Haron, A. W., & Nowroozi, M. R. (2013). Evaluation of the effects of cryopreservation on viability, proliferation and colony formation of human spermatogonial stem cells *in vitro* culture. *Andrologia*, 45(1), 26-34. doi:10.1111/j.1439-0272.2012.01302.x
- Mizrahi, A., & Lazar, A. (1988). Media for cultivation of animal cells: an overview. *Cytotechnology*, 1(3), 199-214
- Montes, M., Quicaño, I., Quispe, R., Quispe, E., & Alfonso, L. (2013). Quality characteristics of Huacaya alpaca fibre produced in the Peruvian Andean Plateau region of Huancavelica. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(1), 33-38. doi: 10.5424/sjar/2008061-5258

Morena, A. R., Boitani, C., Pesce, M., De Felici, M., & Stefanini, M. (1996). Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *Journal of andrology*, 17(6), 708-717. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1996.tb01856.x>.

Muchotrigo, D., (2017). Efecto de la adición de tempol y catalasa al dilutor para la criopreservación de semen de alpaca (Tesis de Pregrado). Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

Mujica, F. R., Tenorio, M., Rodríguez, Godos, P., Huamani, L. & Ochatoma, A. (2015). Características biométricas testiculares e Incidencia de anormalidades genitales en alpacas (Informe Final de Investigación). Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.

Mutoji, K. N., & Hermann, B. P. (2017). Defining the Phenotype and Function of Mammalian Spermatogonial Stem Cells. En J. Oatley & M. Griswold (Ed.) *The Biology of Mammalian Spermatogonia* (pp. 67-90). New York, USA: Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-7505-1

Nagano, M. C. (2003). Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biology of reproduction*, 69(2), 701-707. doi: 10.1095/biolreprod.103.016352

Nagy, Z. P., Varghese, A. C., & Agarwal, A. (2017). Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos. *Methods in Molecular Biology*, 1568. doi: 10.1007/978-1-4939-6828-2

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2006). Spermatogonial stem cells. In *Methods in enzymology* (Vol. 419, pp. 259-282). Academic Press. doi: 10.1016/S0076-6879(06)19011-4

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological reviews*, 92(2), 577-595. doi:10.1152/physrev.00025.2011

Oatley, J. M., Oatley, M. J., Avarbock, M. R., Tobias, J. W., & Brinster, R. L. (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*, 136(7), 1191-1199. doi:10.1242/dev.032243

Oatley, J. M., Reeves, J. J., & McLean, D. J. (2004). Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during *in vitro* culture. *Biology of reproduction*, 71(3), 942-947. doi: 10.1095/biolreprod.104.028894.

O'Donnell-Tormey, J., Nathan, C. F., Lanks, K., DeBoer, C. J., & De La Harpe, J. (1987). Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, 165(2), 500-514. doi:10.1084/jem.165.2.500

Ozkavukcu, S., & Erdemli, E. (2002). Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara medical school*, 24(4), 187-196.

Pan, Y., Yu, S., Zhang, P., Wang, B., Zhu, D., Liu, Y., & Zeng, X. (2017). Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of integrative agriculture*, 5(16), 1120-1129. doi:10.1016/s2095-3119(16)61489-2.

Paredes, M., Membrillo, A., Azor, P., Machaca, J., Torres, D., & Serrano, A. (2013). Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Small ruminant research*, 111(1-3), 31-40. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.09.017.

Phelan, K., & May, K. M. (2015). Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current protocols in cell biology*, 66:1.1.1-1.1.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0101s66

- Quispe, E. C., Rodríguez, T. C., Iñiguez, L. R., & Mueller, J. P. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 45, 1-14. doi:10.1017/S1014233909990277
- Renieri, C., Valbonesi, A., La Manna, V., Antonini, M., & Asparrin, M. (2009). Inheritance of Suri and Huacaya type of fleece in Alpaca. *Italian Journal of Animal Science*, 8(1), 83-91. doi: 10.4081/ijas.2009.83
- Reuveny, S., Kim, Y. J., Kemp, C. W., & Shiloach, J. (1993). Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 38(5), 619-623. doi:10.1007/bf00182800
- Romrell, L. J., Bellvé, A. R., & Fawcett, D. W. (1976). Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity: a morphological characterization. *Developmental biology*, 49(1), 119-131.
- Roosen-Runge, E. C. (1962). The process of spermatogenesis in mammals. *Biological reviews*, 37(3), 343-376. doi:10.1111/j.1469-185x.1962.tb01616.x
- Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2004). Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Developmental biology*, 274(1), 158-170. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.004
- Salim, B., & Entwistle, K. W. (1982). Duration of the seminiferous epithelial cycle in hybrid Bos indicus× Bos taurus bulls. *Journal of reproduction and fertility*, 66(2), 729-734.
- Santiani, A. (2012). Uso de dos Análogos de Superóxido Dismutasa para prevenir la Desestabilización Espermática Prematura durante la Criopreservación y Vitricación en

espermatozoides de Alpaca (Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Santiani, A., Huanca, W., Sapana, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., & Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian journal of Andrology*, 7(3), 303-309. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x

Schönfeldt, V. V., Krishnamurthy, H., Foppiani, L., & Schlatt, S. (1999). Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. *Biology of reproduction*, 61(3), 582-589. doi:10.1095/biolreprod61.3.582

Sepúlveda, N., & Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian journal of andrology*, 7(3), 303-309. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x

Shinohara, T., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (1999). $\beta 1$ -and $\alpha 6$ -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5504-5509. doi:10.1073/pnas.96.10.5504

Sifuentes E., Albújar V., Cajas J., León C., Santa María J. (2018). Boletín estadístico de producción agrícola y ganadera IV Trimestre 2017. *Dirección de Estadística Agraria*. Recuperado de: http://siea.minag.gob.pe/siea/sites/default/files/produccion-agricola-ganadera-ivtrimestre2017_220318.pdf

Smith, C. L., Peter, A. T., & Pugh, D. G. (1994). Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology*, 41(3), 573-592. doi:10.1016/0093-691x(94)90169-j

Sumar, J. (1991). Contribution of the radioimmunoassay technique to knowledge of the reproductive physiology of South American camelids. In *Isotope and Related Techniques in Animal Production and Health* (pp. 353-379). FAO/IAEA, Vienna, Austria

Tagelenbosch, R. A. J., & de Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 290(2), 193–200. doi:10.1016/0027-5107(93)90159-d

Takashima, S., & Shinohara, T. (2018). Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. *Stem cell research*, 29, 46-55. doi: 10.1016/j.scr.2018.03.006

Tian, X., Meng, X., Wang, L., Song, Y., Zhang, D., Ji, Y., Li, X. & Dong, C. (2015). Molecular cloning, mRNA expression and tissue distribution analysis of Slc7a11 gene in alpaca (*Lama paco*) skins associated with different coat colors. *Gene*, 555(2), 88-94. doi:10.1016/j.gene.2014.10.029

Tibary, A., & Memon, M. A. (1999). Reproduction in the male South American camelidae. *Journal of camel Practice and Research*, 6(2), 235-248.

Tibary A & Ruiz A (2018). Investigation of male infertility in llamas and alpacas. *SPERMOVA*. 8(1): 33-48. doi: 10.18548/aspe/0006.04

Tibary, A., & Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. *Small Ruminant Research*, 61(2), 283-298. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.07.018.

Tseng, Y. T., Liao, H. F., Yu, C. Y., Mo, C. F., & Lin, S. P. (2015). Epigenetic factors in the regulation of prospermatogonia and spermatogonial stem cells. *Reproduction*. doi:10.1530/rep-14-0679

Valdivia, M. (2018) Efecto de la suplementación de maca roja o negra en un potencial dilutor y en la criopreservación de células madre espermato goniales (SSC) de alpaca (*Vicugna pacos*) tanto en SSC aisladas como en fragmentos testiculares. Tesis doctoral, Universidad Nacional Cayetano Heredia. Lima, Perú.

Valdivia, M., Ruiz, J., Limaymaymanta, O., Castañeda, S., Lévano, G., Carmen, R., Dávila, D., Valle, A., Rodriguez, L., Céliz, R., Chuquispuma, E., Vásquez, J. (2015). Establecimiento de protocolos de criopreservación para células madre espermato goniales de alpaca (*Vicugna pacos*). Libro de resúmenes VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos, Sétima Edición.

Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svenningsen, Å. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L. & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in vitro*, 24(4), 1053-1063. doi:10.1016/j.tiv.2010.03.016

Vizcarra, L. (2013). Caracterización fenotípica y productiva de la explotación de alpacas en la comunidad de Huaytire y establecimiento de una línea de base sistematizada con fines de Mejoramiento Ganadero—Tacna 2013 (Tesis de Maestría). Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú.

Watanabe, I., & Okada, S. (1967). Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y). *The Journal of cell biology*, 32(2), 309-323. doi:10.1083/jcb.32.2.309

Waymouth, C. (1970). Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In vitro*, 6(2), 109-127.

Will, M. A., Clark, N. A., & Swain, J. E. (2011). Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(8), 711-724. doi: 10.1007/s10815-011-9582-0

Woelders, H., & Malva, A. P. (1998). How important is the cooling rate in cryopreservation of (bull) semen, and what is its relation to thawing rate and glycerol concentration. *Reproduction in Domestic Animals*, 33(3-4), 299-305. doi:10.1111/j.1439-0531.1998.tb01361.x

World Health Organization (WHO). "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. Fifth Edition (2010). http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf.

Wu, X., Goodyear, S. M., Abramowitz, L. K., Bartolomei, M. S., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2012). Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Human reproduction*, 27(5), 1249-1259. doi:10.1093/humrep/des077

Yalta, C. (2014). Variabilidad genética poblacional de alpacas *Vicugna pacos* determinada por marcadores microsatélites en el Centro Piloto Munay Paqocha y del fundo Itita, Puno-Perú (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Yang, Z., & Xiong, H. R. (2012). Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. In *Biomedical Tissue Culture*. InTech. doi: 10.5772/52301

Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99-117. doi: 10.1002/rmb2.12024

Yokoyama, W. M., Thompson, M. L., & Ehrhardt, R. O. (2012). Cryopreservation and thawing of cells. *Current protocols in immunology*, 99(1), A-3G. doi: 10.1002/0471142735.ima03gs99

Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y., & Nishimune, Y. (2003). Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biology of reproduction*, 69(4), 1303-1307. doi: 10.1095/biolreprod.103.015958

Zacà, C., & Borini, A. (2017). Human Oocytes Slow-Rate Freezing: Methodology. En Z. P. Nagy, A. C. Varghese & A. Agarwal (Ed.), *Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos* (pp. 105-117). Humana Press, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-6828-2

Zeng, W., Avelar, G. F., Rathi, R., Franca, L. R., & Dobrinski, I. (2006). The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. *Journal of andrology*, 27(4), 527-533. doi: 10.2164/jandrol.05143

Zhmakin, A. I. (2008). *Fundamentals of cryobiology*. Berlin: Springer. doi: 10.1007/b10800

ANEXOS

Anexo 1: Composición de los medios de cultivo empleados

Composición	DMEM	STEMPRO
BSA (Sigma-Aldrich, cat. no. A3311)	5 mg/ml	5 mg/ml
SFB (Sigma-Aldrich, cat. no. F4135)	1 %	1 %
MEM Vitamin solution (100X) (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, cat. no. 11120)	10 µl/ml	10 µl/ml
STEMPRO™ Neural Supplement (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, cat. no. A10508)	-	0.05 µl/ml
STEMPRO™-34 Nutrient Supplement (40X) (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, cat. no. 10641)	-	0.5 µl/ml
Piruvato de Sodio (Sigma-Aldrich, cat. no. P5280)	30 mg/ml	30 mg/ml
MEM non-essential aminoacid solution (100X) (Sigma-Aldrich, cat. no. M7145)	10 µl/ml	10 µl/ml
L-Glutamina (Sigma-Aldrich, cat. no. G8540)	0.29 mg/ml	0.29 mg/ml
Penicilina (Sigma-Aldrich, cat. no. P3032)	100 µg/ml	100 µg/ml
Sulfato de Estreptomicina (Sigma-Aldrich, cat. no. S1277)	100 µg/ml	100 µg/ml
Sodium DL-lactate solution (60% w/w) (Sigma-Aldrich, cat. no. L1375)	1 µl/ml	1 µl/ml
Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement (Sigma-Aldrich, cat. no. I1884)	1 µl/ml	1 µl/ml
(+)-α-Tocopherol (Sigma-Aldrich, cat. no. T1539)	10 µl/ml	10 µl/ml
Gentamicina	50 µg/ml	50 µg/ml
Factores de crecimiento: GDNF humano (Sigma-Aldrich, cat. no. SRP3309) FGF-4 humano (Sigma-Aldrich, cat. no. SRP3261) EGF humano (Sigma-Aldrich, cat. no. E9644) LIF humano (Sigma-Aldrich, cat. no. SRP9001)	1 µl/ml	-
Leche materna	-	1 µl/ml

Anexo 2: Muestras empleadas en el presente trabajo, se detallan fechas de trabajo y medios de cultivo

ANIMAL	TIPO DE MUESTRA	PROLIFERACIÓN						PROLIFERADAS Y CRIOPRESERVADAS					
		DBA-	DBA+	ED	MITO	7AAD	EA	DBA-	DBA+	ED	MITO	7AAD	EA
1	FRESCA	71.4	5.2	19.4				79.8	6.3	9.5	80.0	8.2	10.0
1	DESCONGELADA												
2	FRESCA	58.1	11.4	26.2				58.6	20.2	18.1	73.6	18.9	3.9
2	DESCONGELADA	96.0	0.7	1.2	86.3	1.5	11.4						
3	FRESCA	80.5	11.6	5.2				73.8	9.8	11.0	80.0	8.2	10.0
3	DESCONGELADA	81.2	3.0	9.7	17.6	15.8	3.0						
4	FRESCA	74.6	4.1	20.0	88.0	4.0	4.6	83.2	8.2	7.2	45.7	3.9	1.8
4	DESCONGELADA	91.5	1.3	4.9	57.8	19.2	18.2	82.7	0.6	2.0	68.5	25.9	3.0
5	FRESCA	47.3	17.0	29.8	72.5	13.7	10.4	74.9	8.9	12.0	39.4	2.8	6.5
5	DESCONGELADA	67.7	3.6	21.5	20.1	14.7	5.4	82.2	1.0	4.2	77.3	12.7	9.1
6	FRESCA	80.0	1.2	20.5	53.8	12.9	15.1						
6	DESCONGELADA	90.6	2.0	2.2	59.6	16.2	23.0						
7	FRESCA	34.8	17.5	52.1	59.2	13.2	5.3	97.1	0.8	1.9	4.6	3.9	0.2
7	DESCONGELADA	96.8	0.1	2.3	88.3	4.1	7.4	91.9	0.4	0.9	71.8	19.4	6.6
8	FRESCA	69.0	6.3	24.0	85.5	2.3	9.0	65.4	14.0	15.9	81.4	1.3	10.8
8	DESCONGELADA	89.2	0.5	7.9	71.3	2.6	23.8	82.6	0.3	1.8	76.7	10.1	11.9
9	FRESCA	49.5	6.6	38.0	87.3	2.2	7.1	72.9	10.9	10.4	87.9	1.2	7.0
9	DESCONGELADA	95.1	1.7	1.1	77.8	3.7	15.9	82.0	0.7	1.7	77.8	12.8	7.4
10	FRESCA	35.3	5.6	52.2	77.1	5.6	12.2	69.5	9.6	16.2	78.6	4.1	12.8
10	DESCONGELADA	34.7	7.2	47.7	34.8	44.0	10.0	87.3	0.8	2.6	64.2	23.7	10.5
11	FRESCA	48.5	14.4	33.2	77.9	13.2	10.1	89.3	1.2	2.7	83.9	2.8	11.8
11	DESCONGELADA	94.5	0.7	3.6	74.3	10.1	15.2	93.4	0.8	2.3	61.0	28.4	9.9
12	FRESCA	53.8	10.7	30.8	79.1	14.5	6.0	89.4	1.4	3.3	85.7	2.1	10.9
12	DESCONGELADA	76.9	1.5	19.7	68.7	20.7	10.2	89.6	0.4	1.3	75.4	17.2	7.2
13	FRESCA	65.5	5.1	25.8	90.3	4.0	5.7	92.8	1.0	4.0	88.4	2.8	7.9
13	DESCONGELADA	83.1	1.6	13.3	41.2	48.7	5.5	86.7	0.7	3.7	80.4	13.0	6.2
14	FRESCA	92.9	0.6	3.1	69.4	18.4	12.2	69.1	5.7	21.5	64.2	22.0	10.3
14	DESCONGELADA	81.6	2.2	14.2	34.7	59.1	6.7	92.2	0.7	5.7	71.8	20.5	9.0
15	FRESCA	74.3	5.4	15.3	84.7	3.5	9.3	87.2	3.5	0.7	68.2	3.7	9.0
15	DESCONGELADA	68.8	0.2	0.7	80.0	0.2	16.3	80.5	0.4	0.5	70.4	20.5	8.3
16	FRESCA	71.8	7.2	17.3	82.6	9.5	6.5	85.8	1.6	2.8	82.4	5.1	10.2
16	DESCONGELADA	79.3	0.4	0.7	85.6	1.0	11.7	83.3	0.7	2.4	75.6	18.6	6.0
17	FRESCA	58.4	19.0	19.8	84.9	1.0	3.6	87.9	2.7	5.5	88.2	4.7	5.9
17	DESCONGELADA	83.3	2.1	12.7	10.8	88.1	0.7						
18	FRESCA	66.5	11.6	18.8	78.4	16.6	4.1	54.6	15.0	27.4	66.4	26.1	3.6
18	DESCONGELADA	79.6	0.9	1.0	80.1	3.6	12.3	90.3	1.2	7.1	69.9	23.9	4.0
19	FRESCA	80.6	2.6	14.3	83.1	7.0	10.8	52.1	2.9	35.5	69.6	19.6	9.6
19	DESCONGELADA	93.7	0.2	5.1	76.8	11.1	11.2	85.7	1.0	8.4	81.1	9.8	9.0
20	FRESCA	78.1	4.1	15.5	83.1	7.0	10.8	85.4	2.9	8.8	79.4	12.7	8.1
20	DESCONGELADA	86.1	0.7	11.7	66.1	23.0	9.9	91.1	1.1	5.4	77.8	14.4	7.5
21	FRESCA	83.3	3.2	11.6	70.5	18.4	9.3	93.4	1.1	1.7	85.0	4.9	9.2
21	DESCONGELADA	93.1	0.6	5.0	44.6	45.4	7.9	86.7	2.4	9.7	66.7	27.9	5.3
22	FRESCA	78.9	3.0	15.4	83.1	9.4	7.9	73.5	0.5	1.5	87.2	1.1	9.4
22	DESCONGELADA	94.5	0.1	4.8	66.6	24.3	8.6	87.6	0.8	6.3	84.0	6.3	8.1
23	FRESCA	87.7	2.9	7.5	82.7	8.0	9.0	68.9	10.4	18.6	77.3	10.8	8.4
23	DESCONGELADA	95.1	0.9	2.8	69.5	13.2	17.6	80.9	3.7	13.0	81.3	10.9	6.9

LEYENDA:

	MUESTRA PERDIDA POR CONTAMINACIÓN
	CULTIVADAS EN STEMPO Y LECHE MATERNA
	CULTIVADAS EN DMEM Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Anexo 3: Parámetros iniciales evaluados

Muestra	Peso promedio testicular (PPT)	Concentración espermática (CE)	Movilidad espermática (ME)	Características
1	16,08	284,00	53,66	Normal
2	20,04	308,00	56,07	Presencia de sangre coagulada
3	12,00	378,00	38,27	Normal
4	14,27	145,00	49,37	Normal
5	21,34	632,00	57,41	Normal
6	15,10	148,00	18,45	Exceso de glóbulos rojos
7	12,09	105,00	35,22	Normal
8	13,15	161,00	35,55	Testículo único
9	11,94	66,00	2,30	Normal
10	12,18	451,00	11,26	Normal
11	12,33	343,50	39,69	Normal
12	10,04	322,50	36,76	Normal
13	9,53	219,00	32,41	Normal
14	9,71	301,00	27,33	Normal
15	12,13	198,00	6,83	Normal
16	7,84	130,00	18,00	Normal
17	5,43	71,00	22,40	Normal
18	15,08	112,00	58,94	Normal
19	12,90	198,00	48,54	Normal
20	12,30	122,00	23,40	Normal
21	8,93	264,00	60,57	Normal
22	10,94	212,00	2,26	Normal
23	7,39	164,00	7,69	Normal

Anexo 3: Valores de vitalidad de las células testiculares

Muestra	Células vivas	Células muertas	TOTAL
1	64	47	111
2	109	65	174
3	166	69	235
4	396	67	463
5	1541	282	1823
6	369	218	587
7	38	10	48
8	313	74	387
9	46	63	109
10	207	79	286
11	195	56	251
12	85	53	138
13	93	50	143
14	91	26	117
15	87	24	111
16	110	36	146
17	178	40	218
18	122	55	177
19	250	69	319
20	181	113	294
21	94	42	136
22	212	100	312
23	136	73	209

Anexo 4: Porcentaje de vitalidad de las células testiculares

Muestra	Vitalidad (% de células vivas)	Concentración (millones.ml ⁻¹)
1	57,7	20
2	62,6	21
3	70,6	19
4	85,5	8
5	84,5	40
6	62,9	29
7	79,2	25
8	80,9	17
9	42,2	41
10	72,4	24
11	77,7	8
12	61,6	21
13	65,0	13
14	77,8	7
15	78,4	29
16	75,3	28
17	81,7	8
18	68,9	8
19	78,4	17
20	61,6	15
21	69,1	7
22	67,9	16
23	65,1	17
PROMEDIO	70.74 ± 2.13	19.04 ± 2.05

Anexo 5: Estadísticos evaluados (Pruebas de normalidad)

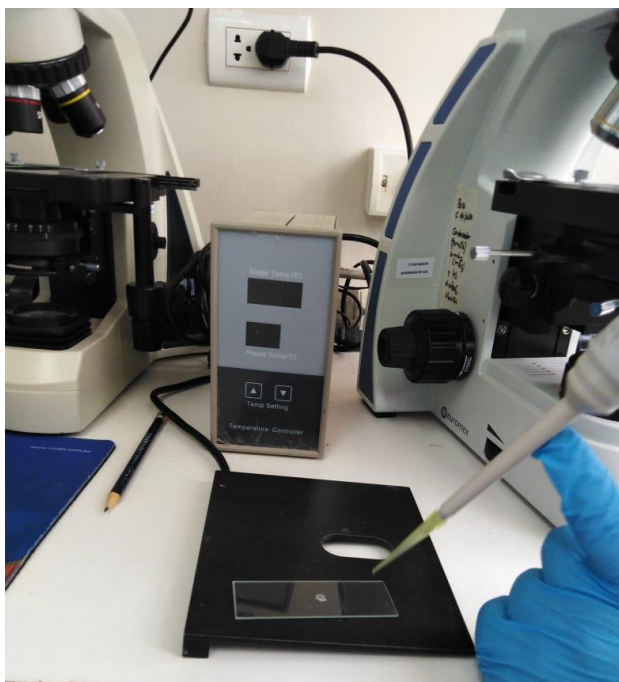
Pruebas de normalidad							
PARÁMETRO	MEDIO DE CULTIVO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DBA POSITIVO FP	STEMPRO	,236	14	,034	,897	14	,101
	DMEM	,387	6	,005	,622	6	,001
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL FP	STEMPRO	,181	14	,200 [*]	,882	14	,062
	DMEM	,359	6	,015	,694	6	,005
APOPTOSIS FP	STEMPRO	,187	14	,198	,897	14	,102
	DMEM	,295	6	,112	,794	6	,052
APOPTOSIS TEMPRANA FP	STEMPRO	,146	14	,200 [*]	,956	14	,649
	DMEM	,223	6	,200 [*]	,854	6	,168
DIFERENCIACIÓN TEMPRANA FP	STEMPRO	,125	17	,200 [*]	,940	17	,315
	DMEM	,213	6	,200 [*]	,951	6	,748

Pruebas de normalidad							
PARÁMETRO	MEDIO DE CULTIVO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DBA POSITIVO CP	STEMPRO	,228	13	,064	,804	13	,008
	DMEM	,247	9	,120	,825	9	,039
DIFERENCIACIÓN TEMPRANA CP	STEMPRO	,210	13	,119	,774	13	,003
	DMEM	,264	9	,070	,838	9	,055
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL CP	STEMPRO	,156	13	,200 [*]	,927	13	,311
	DMEM	,306	9	,015	,800	9	,020
APOPTOSIS CP	STEMPRO	,255	13	,021	,842	13	,022
	DMEM	,262	9	,074	,804	9	,023
APOPTOSIS TEMPRANA CP	STEMPRO	,149	13	,200 [*]	,930	13	,336
	DMEM	,175	9	,200 [*]	,942	9	,604

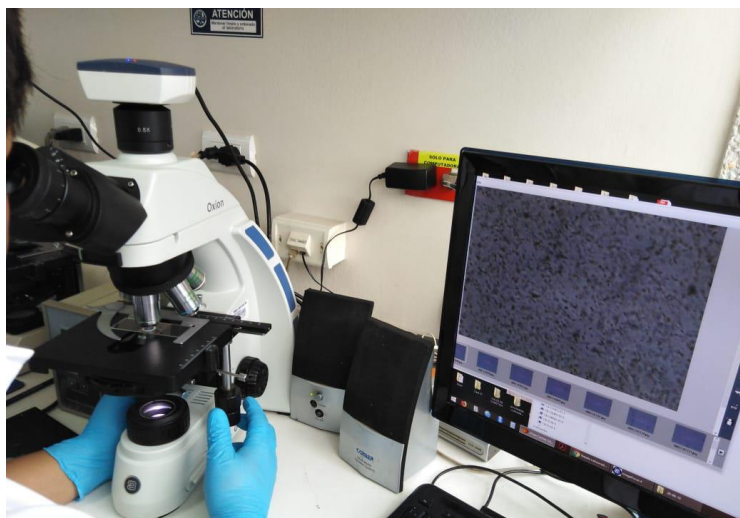
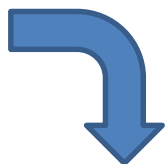
Pruebas de normalidad

PARÁMETRO	MEDIO DE CULTIVO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DBA POSITIVO PC	STEMPRO	,151	16	,200 [*]	,895	16	,068
	DMEM	,336	6	,033	,827	6	,102
DIFERENCIACIÓN TEMPRANA PC	STEMPRO	,152	16	,200 [*]	,930	16	,243
	DMEM	,186	6	,200 [*]	,912	6	,452
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL PC	STEMPRO	,259	16	,005	,748	16	,001
	DMEM	,164	6	,200 [*]	,942	6	,672
APOPTOSIS PC	STEMPRO	,308	16	,000	,696	16	,000
	DMEM	,159	6	,200 [*]	,974	6	,917
APOPTOSIS TEMPRANA PC	STEMPRO	,204	16	,075	,912	16	,127
	DMEM	,342	6	,027	,724	6	,011

Anexo 6: Galería de fotos de evaluación de parámetros espermáticos



1) Preparación de láminas para la evaluación de movilidad espermática



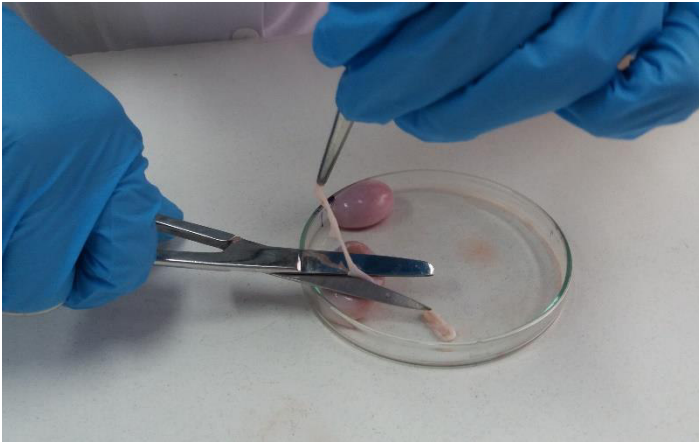
2) Evaluación de movilidad espermática y registro en video



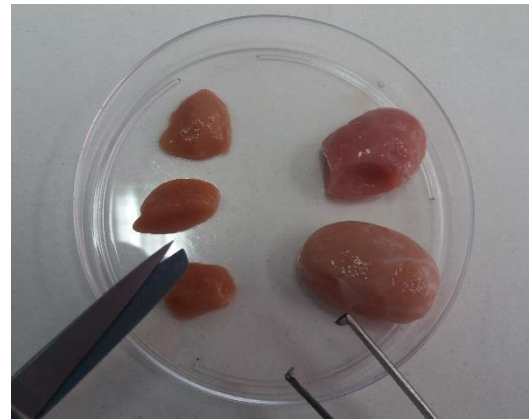
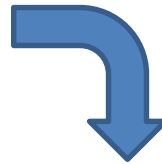
3) Evaluación de la concentración espermática



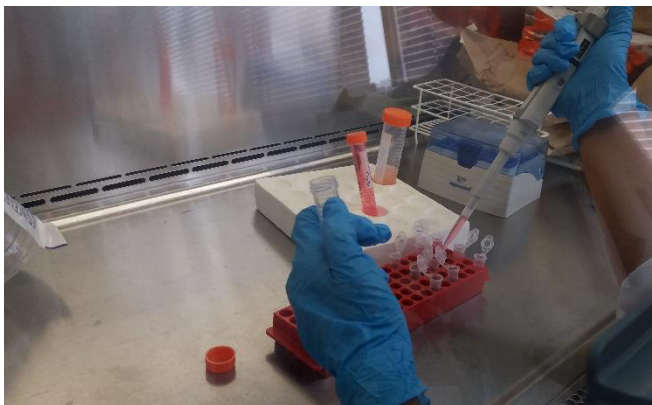
Anexo 7: Galería de fotos de procesamiento de las muestras testiculares



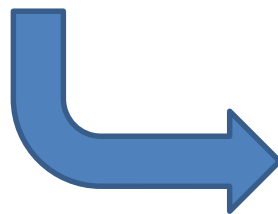
1) Procesamiento de testículos de alpaca.



2) Testículos de alpaca sin la capa albugínea y los trozos de tejido empleados para el aislamiento de células testiculares



3) Recuperación de las células testiculares en medio de aislamiento.



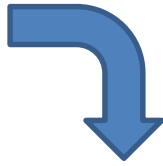
4) Suspensión de células



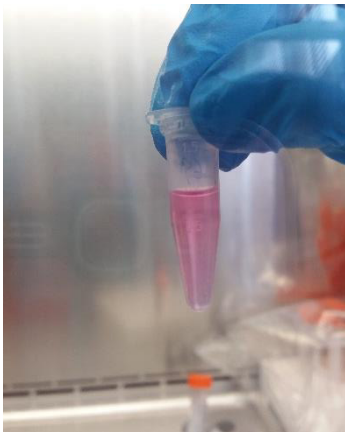
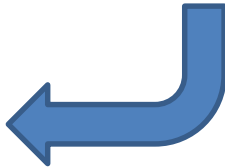
5) Centrifugación de las muestras



6) Digestión enzimática de las muestras



7) Centrifugación



8) Obtención de la suspensión de células testiculares (SCI)